

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

**XVIII Ciclo – 2002 - 2006**

**COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE**

**TESI DI DOTTORATO**

**TITOLO**

**IL SOVRACCARICO DI PRESSIONE INTERMITTENTE  
PROMUOVE DISFUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA E  
RAREFAZIONE VASCOLARE IN ASSENZA DI IPERTROFIA  
CARDIACA**

**TUTORE  
Chiar.mo  
Prof. Massimo Chiariello**

**CANDIDATA  
Dott.(ssa)  
Cinzia Perrino**

## **Introduzione**

L'ipertrofia cardiaca è la risposta universale del cuore allo stress, provocata secondo la legge di Laplace dall'aumento della tensione parietale (1). Anche se inizialmente descritta come una risposta benefica e necessaria allo scopo di preservare un'adeguata gittata cardiaca in condizioni di sovraccarico (1), in seguito l'ipertrofia ventricolare sinistra è stata riconosciuta come un fattore di rischio cardiovascolare indipendente (2). Numerosi studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che l'inibizione della risposta ipertrofica è possibile mediante svariate strategie molecolari e non determina instabilità emodinamica, nonostante l'aumentato stress parietale (3, 4). In studi animali e clinici l'inibizione dell'ipertrofia ventricolare sinistra di solito determina un miglioramento della disfunzione ventricolare sinistra (3-5). Pertanto, l'ipertrofia cardiaca è stata recentemente indicata come un precursore dello scompenso cardiaco ed un target terapeutico precoce (3, 6, 7). Tuttavia, l'inibizione della risposta ipertrofica non sempre esercita un effetto benefico (8-12) e, soprattutto, non è assolutamente necessaria per migliorare la disfunzione ventricolare sinistra (13, 14). Inoltre, l'ipertrofia è anche la risposta cardiaca a numerosi stress fisiologici quali esercizio fisico e gravidanza, ed in questo caso non progredisce verso lo scompenso cardiaco. Pertanto, il ruolo preciso dell'ipertrofia nel futuro sviluppo di scompenso cardiaco è sconosciuto.

Non sono noti i meccanismi mediante cui il cuore distingue tra sovraccarico fisiologico o patologico generando uno specifico fenotipo. La maggior parte delle cause patologiche sono solitamente croniche, mentre quelle fisiologiche sono di per sé intermittenti, pertanto è possibile che la durata dello stimolo sia critica in questa differenziazione. Tuttavia, è altresì possibile che diverse forme di stress siano percepite differentemente dal muscolo cardiaco, anche se applicate per lo stesso intervallo di tempo, producendo diverse risposte fenotipiche.

In questo studio abbiamo ipotizzato che la natura dello stress, non la sua durata, svolga un ruolo importante nello sviluppo di ipertrofia patologica. Per testare la nostra ipotesi

abbiamo stabilito e caratterizzato un nuovo modello murino di sovraccarico di pressione intermittente. Questo modello ci ha consentito di applicare uno stress patologico con intervalli e durata identici ad un allenamento con nuoto. Come il nuoto, il sovraccarico di pressione intermittente ha determinato una lieve risposta ipertrofica in assenza di ri-espressione di geni fetali. Tuttavia, il sovraccarico di pressione intermittente ha determinato l'attivazione di pathway molecolari patologici e lo sviluppo di anomalie strutturali e funzionali che potevano essere prevenute, almeno in parte, dalla manipolazione genetica del sistema dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ AR). Il nostro studio dimostra che l'ipertrofia cardiaca è una risposta tempo-dipendente al sovraccarico che non conduce, di per sé, allo scompenso cardiaco. Al contrario, il profilo molecolare indotto dallo stress patologico, ed in particolare l'attivazione di segnali intracellulari che conducono a disfunzione  $\beta$ -adrenergica, determina la progressione del normale cardiomiocita verso lo scompenso cardiaco.

## **Materiali e Metodi**

### *Protocollo sperimentale*

In questo studio sono stati utilizzati topi wild-type (WT) C57BL/6 di sesso femminile per lo studio a 4 settimane. Topi WT e topi transgenici di entrambi i sessi, tutti in un background genetico C57BL/6, sono stati utilizzati per lo studio ad 1 settimana. Topi transgenici overesprimenti una forma cataliticamente inattiva di PI3K $\gamma$  (topi PI3K $\gamma_{\text{inact}}$ ) sono stati precedentemente descritti (13, 26). Tutti gli animali sono stati maneggiati secondo i protocolli del comitato etico del Duke University Medical Center.

### *Modelli di ipertrofia fisiologica indotta dall'esercizio fisico*

L'ipertrofia fisiologica è stata indotta in topi come precedentemente dimostrato (15), allenando i topi per 90 min due volte al giorno o mediante corsa volontaria in gabbie fornite di ruota (16).

### *Modelli di sovraccarico di pressione cronico o intermittente*

Il sovraccarico cronico di pressione è stato indotto nel topo mediante costrizione aortica cronica (cTAC) come precedentemente descritto (17), tranne che la sutura è stata posizionata tra la arteria carotide sinistra e l'arteria ascellare sinistra. Modificando il modello cTAC abbiamo stabilito un nuovo modello di sovraccarico di pressione intermittente (iTAC). Brevemente, una sutura è stata posizionata intorno all'aorta tra l'arteria carotide sinistra e l'arteria ascellare sinistra, ed è stata successivamente esterorizzata sul torace del topo per essere facilmente manovrata. Tirando la sutura nei topi è stata indotta una costrizione aortica transiente della durata di 90 min due volte al giorno. La durata dello stress emodinamico intermittente è stata scelta per mimare la durata dell'allenamento con nuoto. Al termine dello studio, l'efficacia del sovraccarico di pressione è stata valutata in tutti gli animali misurando le



pressioni arteriose nell'arteria carotide sinistra (prossimale alla sutura) e l'arteria ascellare sinistra (distale alla sutura) durante la costrizione intermittente. Per i topi iTAC, 3 condizioni erano richieste per l'inclusione nello studio: 1) l'assenza di un basale gradiente di pressione tra le arterie prossimale e distale ; 2) un aumento di almeno 40 mmHg della pressione sistolica dell'arteria prossimale durante la costrizione intermittente, con o senza riduzione della pressione sistolica dell'arteria distale; 3) la regressione del sovraccarico di pressione dopo il rilascio della sutura. In questo studio sono stati utilizzati tre diversi gruppi di controllo: 1) topi wild-type sedentari (CON); 2) topi wild-type di controllo per l'intervento cTAC (SHAM), in cui la sutura è stata passata intorno all'aorta ma non è stata legata; 3) topi wild-type di controllo per l'intervento iTAC (iSHAM), in cui la sutura è stata passata intorno all'aorta, esteriorizzata al dorso del topo, ma mai tirata.

#### *Somministrazione del $\beta$ -bloccante metoprololo*

Il  $\beta$ -bloccante metoprololo è stato somministrato in acqua da bere (350 mg/kg di peso corporeo/giorno) come precedentemente dimostrato (49) a partire da 7 giorni prima dell'intervento di iTAC fino al termine dello studio.

#### *Ecocardiografia Transtoracica*

Studi di ecocardiografia seriale sono stati eseguiti in topi coscienti di tutti i gruppi con un ecocardiografo HDI 5000 (Philips) ed il sistema ad alta risoluzione Vevo 770 (VisualSonics) dopo 4 settimane come precedentemente descritto (26).

#### *Studi di espressione genica*

Al termine dello studio, i cuori sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Campioni di RNA sono stati preparati da tessuto polverizzato ed estratti con il metodo del Tripure (Roche). L'espressione di alcuni geni selezionati è stata valutata mediante real-

time PCR quantitativa con una apparecchiatura ABI 6700 (18, 50, 51). Tutte le reazioni includevano uno steard interno di actina.

### *Studi istologici*

I ventricoli sinistri dei cuori appena espianati sono stati immerse in una soluzione di saccarosio/PBS a 4°C per 2-4 h, posizionati in OCT (optimum cutting temperature compound; Miles Pharmaceuticals), e congelati in azoto liquido. Le sezioni ottenute dai campioni congelati sono state successivamente fissate in 4% paraformaldeide, colorate con Ematossilina/Eosina e Tricromica di Masson. La densità capillare nel muscolo cardiaco è stata misurata mediante identificazione della fosfatasi alcalina endoteliale endogena come precedentemente descritto (52). La densità capillare è stata quantificata esaminando 6 - 10 sezioni casuali reom ad alto ingreimento (400X). Le fotografie sono state ottenute mediante una fotocamera digitale Optometrics e Adobe Premier Version 5.1, e queste immagini sono state analizzate usando un sistema di analisi delle immagini NIH.

### *Determinazione dei livelli di catecolamine plasmatiche*

I livelli plasmatici delle catecolamine epinefrina e norepinefrina sono stati misurati mediante il kit Bi-CAT EIA (Alpco Diagnostics, 17-EA613-192).

### *Determinazione dei livelli totali intracellulari di cAMP*

I livelli totali di cAMP sono stati misurati con il kit AMP-[H3] biotrak assay (Amersham, TRK432).

### *Coltura primaria di cardiomiociti di topo e studi di contrattilità cellulare*

I cardiomiociti sono stati isolati da cuori di topo come precedentemente descritto (53) ed usati per studi di contrattilità. Sono state selezionate cellule di simile lunghezza e le

contrazioni di singole cellule rod-shaped sono state misurate usando un sistema di rilevazione video del contorno cellulare (Crescent Electronics). Le registrazioni sono state effettuate dopo l'applicazione di uno stimolo elettrico in condizioni basali e dopo somministrazione di isoproterenolo (ISO)  $1\mu\text{M}$  come precedentemente dimostrato (27). L'entità dell'accorciamento (% accorciamento delle cellule) è stato calcolato come segue:  $(\text{lunghezza massima} - \text{lunghezza minima}) \times 100 / \text{lunghezza massima}$ . In ogni animale sono state analizzate 10-15 cellule.

#### *Frazionamento delle frazioni di membrane, $\beta\text{AR}$ radiolig binding e saggio di attività dell'adenilato ciclasi*

Le frazioni delle membrane e del citosol ottenute dai ventricoli di topi dei vari gruppi sono state preparate come descritto precedentemente (4). Il dosaggio dei livelli di  $\beta$ -recettore è stato effettuato usando  $20\mu\text{g}$  di proteine dalla frazione di membrana come precedentemente dimostrato (4) usando il ligando  $\beta$ -adrenergico [ $^{125}\text{I}$ ] cianopindolo (250 pM). Tutti i saggi sono stati eseguiti in triplicato, e la densità recettoriale (fmol) è stata normalizzata per i milligrammi (mg) di proteine di membrana. I saggi di attività dell'adenilato ciclasi sono stati eseguiti come precedentemente dimostrato (4), usando  $20\mu\text{g}$  della frazione di membrana fraction. Il cAMP generato dalla reazione è stato quantizzato mediante uno scintillatore (MINAXI -4000).

#### *Immunoprecipitazione ed immunoblotting*

Immunoprecipitazione e immunoblotting sono stati eseguiti come precedentemente descritto (13). La rilevazione è stata eseguita mediante ECL (Amersham Biosciences) e le bande sono state quantizzate mediante un software di densitometria Bio-Rad Fluoro-S Multimager.

### *Attività dell'enzima fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K)*

I saggi dell'attività di PI3K sono stati eseguiti dopo immunoprecipitazione delle isoforme  $\alpha$  e  $\gamma$  di PI3K dalle frazioni citosoliche di cuori di topi come precedentemente descritto (54). L'attività di PI3K associata a  $\beta$ ARK1 è stata misurata dopo immunoprecipitazione di 400  $\mu$ g di proteine dalla frazione di membrana degli stessi cuori mediante un anticorpo policlonale diretto contro  $\beta$ ARK1 (Santa Cruz Biotechnology). I lipidi sono stati estratti con il metodo del cloroformio/metanolo (rapporto 1:1) e la fase organica è stata trasferita su piastre TLC e separata per cromatografia con acido glaciale 2N /propanolo (35:65). Le piastre sono state fatte asciugare e sono state esposte; i segnali autoradiografici sono stati quantizzati usando il software Bio-Rad Flouoro-S Multimager.

### *Curve pressione-volume in topi anestetizzati*

I topi sono stati anestetizzati con una miscela di ketamina (100 mg/Kg) e xylazina (2.5 mg/kg) e collegati ad un ventilatore per piccoli animali dopo intubazione endotracheale. In topi cTAC, la sutura è stata tagliata. Dopo vagotomia bilaterale, una nuova sutura è stata posizionata intorno al tratto trasversale dell'aorta di tutti gli animali per aumentare transitoriamente il post-carico. La cateterizzazione cardiaca è stata ottenuta mediante un catetere a conduttanza di 1.4 French (0.46 mm; Millar Instruments) inserito per via retrograda attraverso l'arteria carotide comune destra dentro il ventricolo sinistro. Un catetere di polyethylene-50 è stato posizionato nella vena giugulare esterna per l'infusione di dobutamina. Sono state registrate misurazioni simultanee di pressione e volume allo stadio basale e dopo intervalli di 3 min di infusione di dobutamina (1, 2 e 5  $\mu$ g/Kg/min). Misurazioni simultanee di pressione e volume sono state registrate ed inoltre sono state ottenute misurazioni in seguito all'aumento del post-carico generato tirando gentilmente la sutura allo scopo di costringere transitoriamente l'aorta. I dati sono stati registrati su supporto digitale a 1,000 Hz ed analizzati mediante un software di analisi PVAN (Millar Instruments).

### *Analisi statistica*

I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. I confronti tra gruppi multipli sono stati effettuati mediante t-test o one-way ANOVA con correzione post hoc per multiple comparazioni. Per tutte le analisi,  $P < 0.05$  è stato considerato significativo.

## **Risultati**

### **La durata del sovraccarico cardiaco determina l'entità della risposta ipertrofica ed il precoce sviluppo di disfunzione ventricolare**

In questo studio abbiamo utilizzato numerosi modelli animali per valutare il ruolo della durata o del tipo di stress nello sviluppo di un fenotipo patologico (**Fig. 1a**, Study Design I). Per indurre ipertrofia fisiologica abbiamo allenato topi femmine mediante nuoto forzato (SWIM) (15) o corsa volontaria in gabbie dotate di ruota (RUN) (16). Per indurre ipertrofia patologica, abbiamo eseguito una costrizione aortica cronica (cTAC) come precedentemente descritto (17), con alcune modifiche (vedi metodi). Per testare il ruolo della durata dello stress sullo sviluppo di disfunzione ventricolare abbiamo istituito un nuovo modello animale per sottoporre il muscolo cardiaco ad uno stress pressorio transiente ed intermittente (iTAC), con una durata identica a quella di un allenamento con il nuoto. In breve, in questo gruppo di animali una sutura è stata posizionata intorno al tratto trasverso dell'aorta ed esteriorizzata sul dorso del topo, in modo da renderla accessibile e facilmente manovrabile dall'esterno (vedi metodi). Topi sedentari e topi con intervento sham sono stati utilizzati come controlli per i gruppi SWIM/RUN ed iTAC/cTAC, rispettivamente. Poichè i dati individuali erano indistinguibili sono stati cumulati e sono qui mostrati come un unico gruppo di controllo (CON).

Per verificare l'efficacia della costrizione intermittente e la sua reversibilità nel gruppo iTAC, al sacrificio abbiamo misurato invasivamente in tutti i topi TAC il gradiente trans-stenotico di pressione sistolica (SPG) (**Fig. 1b**). Dopo 4 settimane, abbiamo misurato il peso delle camere cardiache in tutti i gruppi per quantizzare lo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra. Come previsto, entrambi i protocolli di esercizio fisico hanno indotto un aumento lieve ma significativo del peso del ventricolo sinistro (LV) e del cuore in toto, entrambi normalizzati per il peso corporeo (**Tabella 1** e **Fig. 1c**). L'entità dell'ipertrofia cardiaca sviluppata dai topi iTAC era identica a quella dei topi SWIM e RUN, a differenza dei topi

sottoposti a costrizione cronica dell'aorta che mostrarono una marcata risposta ipertrofica (**Tabella 1** e **Fig. 1c**). Anche se la reversibilità del gradiente non è stata misurata durante ogni esperimento nel gruppo di animali iTAC, e pertanto non è noto l'esatto gradiente in ogni sessione, la ridotta risposta ipertrofica in questo gruppo era indipendente dal gradiente sistolico trans-stenotico misurato al termine dello studio in tutti gli animali (**Fig. 1d**).

Per valutare gli effetti funzionali dell'ipertrofia ventricolare nei diversi gruppi abbiamo eseguito studi di ecocardiografia transtoracica in topi consci. Come mostrato in **Fig. 1e** e **Tabella 1**, solo topi cTAC hanno mostrato un iniziale deterioramento della funzione sistolica dopo 4 settimane di stress, espresso da una ridotta frazione di accorciamento (**Fig. 1e-g**). Questi risultati suggeriscono che il sovraccarico cronico di pressione produce una più marcata risposta ipertrofica e una più rapida compromissione della funzione cardiaca rispetto al sovraccarico di pressione intermittente. Anche se è possibile che altri fattori possano aver contribuito allo sviluppo del fenotipo patologico in topi cTAC, come per esempio la dilatazione dell'arco aortico o l'attivazione di infiammazione locale o sistemica, nel nostro studio non abbiamo mai riscontrato anomalie della funzione cardiaca in assenza di un gradiente di pressione cronico.

Studi precedenti hanno dimostrato che l'aumento dei livelli di catecolamine svolge un ruolo cruciale nello sviluppo di ipertrofia in risposta al cronico sovraccarico di pressione (18), ma è anche richiesto per ottenere gli adattamenti fisiologici che si verificano durante l'esercizio fisico (19, 20). Abbiamo precedentemente dimostrato che il cronico sovraccarico di pressione produce un marcato aumento della trascrizione renale di renina (18). Tale fenomeno è regolato in larga parte dalla stimolazione  $\beta$ AR delle cellule juxtaglomerulari renali, poiché è abolito in topi geneticamente modificati ed incapaci di sintetizzare catecolamine endogene (18). Pertanto, abbiamo misurato con RT-PCR i livelli renali del mRNA della renina (18) per valutare il grado di attivazione di sistema nervoso simpatico nei diversi gruppi. Come mostrato in **Fig. 2a**, i livelli renali di mRNA della renina erano simili

allo stato basale nei diversi gruppi ed aumentavano in tutti i gruppi trattati rispetto ai controlli sedentari o SHAM, in assenza di differenze significative tra i diversi gruppi.

### **Il sovraccarico di pressione intermittente induce un profilo di espressione genica fisiologico ma un fenotipo istologico patologico**

In contrasto con l'ipertrofia fisiologica, quella patologica si associa alla ri-espressione di geni fetali (21, 22). Per caratterizzare il profilo di espressione genica in topi iTAC, abbiamo eseguito studi di RT-PCR per valutare quantitativamente i livelli dell'mRNA di alcuni geni selezionati in cuori dei gruppi CON, SWIM, iTAC e cTAC (n=5 cuori/gruppo). In generale, I cuori iTAC hanno mostrato un quadro di espressione genetica più simile a quello dei cuori SWIM che non cTAC (**Fig. 2b,c**). In particolare, in cuori iTAC abbiamo riscontrato un pattern di espressione dei geni delle catene leggere della miosina  $\beta$  e  $\alpha$  (MHC) hearts di tipo "fisiologico" rispetto ai cuori cTAC, come mostrato da un minore rapporto  $\beta$ MHC/ $\alpha$ MHC (cTAC  $15.1 \pm 1.6$ , iTAC  $1.5 \pm 0.6$ ,  $p < 0.001$ ; **Fig. 2b,c**). Mentre questi risultati potrebbero suggerire che l'applicazione intermittente di uno stress patologico risulti in un fenotipo fisiologico, successivi esperimenti in questo studio non supporteranno questa conclusione.

Poiché l'ipertrofia fisiologica è caratterizzata da una normale o aumentata densità capillare con scarsa o assente fibrosi, abbiamo eseguito studi istologici su sezioni di cuori dei diversi gruppi per determinare il fenotipo strutturale indotto dal sovraccarico intermittente di pressione. Mediante colorazione con ematossilina/eosina (HE) abbiamo dimostrato un'ipertrofia dei cardiomiociti in tutti i gruppi di animali trattati rispetto ai controlli (**Fig. 3a**, pannelli a sinistra). Questi dati concordano con le valutazioni ecocardiografiche e con gli studi morfometrici del ventricolo sinistro e dei singoli cardiomiociti (**Fig. 1 e Tabella 1**). Mediante colorazione con Masson Tricromica abbiamo dimostrato piccole aree di fibrosi in cuori iTAC ( $2.2 \pm 0.3$  % dell'area totale, **Fig. 3a**, pannelli centrali), che erano significativamente inferiori di quelle riscontrate in cuori del gruppo cTAC ( $5.5 \pm 2.0$  % dell'area totale). La fibrosi, un



tipico segno dell'ipertrofia patologica, era assente in cuori SWIM o RUN hearts (**Fig. 3a**, pannelli centrali). Nonostante il fenotipo apparentemente fisiologico, in seguito alla colorazione della fostatasi alcalina endoteliale abbiamo riscontrato in cuori iTAC una marcata e diffusa rarefazione capillare che era equivalente a quella riscontrata in topi cTAC (**Fig. 3a**, pannelli a destra e **Fig. 3b**). Come mostrato in **Fig. 3a,b**, la densità capillare era completamente normale in topi SWIM o RUN.

La marcata rarefazione vascolare riscontrata in cuori iTAC è in netto contrasto con i risultati ecocardiografici e di espressione genica in questo stesso gruppo. Per determinare le proprietà contrattili intrinseche di cardiomiociti esposti a diversi tipi di stress, abbiamo isolato cellule cardiache dai diversi gruppi e misurato la contrattilità di singole cellule cardiache in condizioni basali e dopo stimolazione con il  $\beta$ -agonista isoproterenolo (ISO). In cellule isolate da cuori iTAC abbiamo riscontrato un depresso contrattilità basale (espressa come % accorciamento della cellula:  $76.8 \pm 1.4$  % del controllo,  $p < 0.05$ ; **Fig. 3c**, colonne bianche), ed una ridotta risposta contrattile all'ISO (incremento rispetto al basale: iTAC=  $1.3 \pm 0.06$ , CON=  $1.6 \pm 0.05$ ,  $p < 0.05$ ; **Fig. 3c**, colonne nere). Inoltre, cellule isolate da cuori iTAC hanno mostrato una minore velocità di rilassamento, in condizioni basali e dopo stimolazione con ISO (**Fig. Supplementare 1a**). Per valutare i possibili meccanismi responsabili dell'anomalo rilasciamento in cellule sottoposte a sovraccarico di pressione intermittente abbiamo misurato con immunoblotting i livelli di SERCA2a (Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{++}$  ATPase) e fosfolambano, molecole coinvolte nella regolazione dell'assorbimento del  $\text{Ca}^{++}$ . In topi sottoposti a sovraccarico di pressione, sia cronico sia intermittente, abbiamo riscontrato un selettiva riduzione dei livelli proteici di SERCA2a, mentre i livelli totali e la fosforilazione del suo regolatore fosfolambano non erano modificati (**Fig. Supplementare 1a**). Topi iTAC hanno inoltre mostrato un aumento significativo del peso dell'atrio sinistro (**Tabella 1**), giustificato dall'aumento del post-carico in questi animali, e del rapporto tra il peso del polmone ed il peso corporeo, presumibilmente dovuto a edema polmonare (**Tabella 1**).

Questi risultati dimostrano che nonostante una lieve risposta ipertrofica, la conservata funzione sistolica ed un pattern di espressione genica “favorevole”, il sovraccarico di pressione intermittente determina anomalie morfologiche e disfunzione contrattile cellulare. Inoltre, la ridotta risposta contrattile alla stimolazione  $\beta$ -adrenergica suggerisce che in questi cuori siano presenti anomalie del sistema  $\beta$ AR.

### **I cuori sottoposti a sovraccarico di pressione cronico o intermittente sono caratterizzati da disfunzione dei $\beta$ AR**

I nostri studi precedenti hanno dimostrato che la desensibilizzazione e la downregolazione dei  $\beta$ AR precede lo sviluppo di scompenso cardiaco nel topo (23, 24). Per valutare l'integrità del sistema  $\beta$ -adrenergico in topi iTAC, abbiamo misurato la densità  $\beta$ -recettoriale e l'attività dell'adenilato ciclasi in frazioni di membrana. Solo in cuori cTAC ed iTAC abbiamo riscontrato una significativa riduzione dei livelli di  $\beta$ AR (**Fig. 4a**) ed una ridotta sintesi di cAMP in risposta alla stimolazione con ISO (**Fig. 4b**). Poichè studi precedenti hanno dimostrato che la  $\beta$ AR kinase 1 ( $\beta$ ARK1) svolge un ruolo cruciale nello sviluppo di disfunzione  $\beta$ -adrenergica (25), abbiamo misurato i livelli di  $\beta$ ARK1 in tutti i gruppi di animali. Come previsto, abbiamo riscontrato un significativo incremento dei livelli di  $\beta$ ARK1 solo in topi sottoposti a sovraccarico di pressione, sia cronico sia intermittente (**Fig. 4c**).

$\beta$ ARK1 interagisce con diverse isoforme dell'enzima fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) formando un complesso citoplasmatico che viene traslocato in prossimità dei  $\beta$ AR in seguito alla prolungata stimolazione con agonista (13, 26, 27). In numerosi modelli sperimentali di scompenso cardiaco abbiamo precedentemente riscontrato un significativo incremento dell'attività di PI3K ancorata alla membrana plasmatica (13), dove la generazione di fosfoinositoli è necessaria per promuovere la downregolazione del  $\beta$ AR. In membrane isolate

da cuori iTAC o cTAC abbiamo riscontrato un significativo aumento dell'attività di PI3K associata a  $\beta$ ARK1 (**Fig. 4d**). I cuori di topi iTAC, inoltre, hanno mostrato un'attivazione selettiva dell'isoforma  $\gamma$  di PI3K, simile ai topi cTAC (**Fig. 4e**). In accordo con altri studi (15), abbiamo inoltre riscontrato una significativa e specifica attivazione dell'isoforma  $\alpha$  di PI3K solo in topi SWIM e RUN (**Fig. 4f**). Questi dati dimostrano che sovraccarichi qualitativamente diversi sono percepiti specificamente dal muscolo cardiaco, generando uno specifico pattern di attivazione molecolare. Inoltre, I nostri risultati suggeriscono che anomalie del sistema  $\beta$ -adrenergico, iniziate dall'aumento dei livelli di  $\beta$ ARK1 e dalla traslocazione in membrana di PI3K, si verificano selettivamente in risposta al sovraccarico di pressione, anche quando applicato intermittenemente con una durata identica a quella del nuoto.

### **L'inibizione competitiva di PI3K previene le anomalie del signaling $\beta$ -adrenergico indotte dal sovraccarico di pressione intermittente**

I nostri studi hanno dimostrato che tra le più precoci anomalie indotte dal sovraccarico di pressione intermittente vi sono la desensibilizzazione e downregolazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici. E' noto che cuori scompensati umani sono caratterizzati da profonde anomalie del signaling  $\beta$ -adrenergico, tuttavia non è chiaro se tali anomalie siano direttamente responsabili dello sviluppo di disfunzione ventricolare sinistra (3). Per valutare se le anomalie dei  $\beta$ AR possono essere separate dallo sviluppo di ipertrofia ventricolare in risposta al sovraccarico di pressione e per testare gli effetti della normalizzazione della funzione  $\beta$ -recettoriale sul fenotipo patologico, abbiamo applicato il sovraccarico di pressione intermittente per solo 7 giorni in topi wild-type mice ed in topi transgenici con overespressione cardio-specifica di una forma cataliticamente inattiva di PI3K $\gamma$  (iTAC $\gamma_{\text{inact}}$ , **Fig. 5a**). In studi precedenti, abbiamo infatti dimostrato che l' overespressione di questo

mutante (PI3K $\gamma_{\text{inact}}$ ) preserva la funzione dei  $\beta$ AR in numerosi modelli sperimentali di scompenso cardiaco (13, 26, 27).

Dopo una settimana, solo topi cTAC esibivano un significativo aumento della massa ventricolare sinistra indicata dal rapporto LV/BW (**Fig. 5b**), che era positivamente correlato al gradiente sistolico trans-stenotico (**Fig. 5c**). In contrasto, topi SWIM o iTAC non mostravano un significativo aumento della massa ventricolare sinistra (**Fig. 5b**), o un aumento dell'area totale dei cardiomiociti (cross sectional area,  $\mu\text{m}^2$ : CON  $2,771 \pm 73$ ; SWIM  $2,841 \pm 127$ ; iTAC  $2,665 \pm 60$ ). Allo stesso modo, l'overespressione di PI3K $\gamma_{\text{inact}}$  non esercitava alcun effetto sulla risposta ipertrofica indotta da una settimana di sovraccarico di pressione intermittente (**Fig. 5b**).

Per valutare l'entità di attivazione simpatica indotta da queste diverse forme di stress, abbiamo misurato i livelli plasmatici basali di norepinefrina nei diversi gruppi. Dopo 1 settimana, solo i topi cTAC mostravano un aumento significativo dei livelli delle catecolamine norepinefrina ed epinefrina, mentre i topi iTAC, simili a quelli SWIM, mostravano bassi livelli basali di catecolamine (**Fig. 5d,e**). Tuttavia, le membrane cardiache isolate da cuori iTAC mostravano un aumento dei livelli di  $\beta$ ARK1 e dell'attività di PI3K ad esso associata (**Fig. Supplementare 2a,b**), con conseguente downregolazione e desensibilizzazione dei  $\beta$ AR (**Fig. 5f**). Come previsto, l'overespressione di PI3K $\gamma_{\text{inact}}$  spiazzava l'enzima PI3K endogeno, riducendone l'attività in prossimità del  $\beta$ AR in topi iTAC $\gamma_{\text{inact}}$ , senza alterare i livelli totali di  $\beta$ ARK1 (**Fig. Supplementare 2a,b**). L'inibizione localizzata di PI3K in prossimità del  $\beta$ AR normalizzava il signaling  $\beta$ -adrenergico in topi iTAC $\gamma_{\text{inact}}$  (**Fig. 5f**).

Studi istologici in cuori del gruppo iTAC dopo solo una settimana di stress patologico hanno rivelato scarsi segni di fibrosi (**Fig. 6a** pannelli centrali, MT 20X) e marcata rarefazione capillare (**Fig. 6a** pannelli a destra, CD 400X e **Fig. 6b**). Tali anomalie erano

anche associate ad una significativa downregolazione di SERCA 2a in questi cuori (**Fig. 6c**). in contrasto, topi iTAC $\gamma_{inact}$  esibivano normale densità vascolare (**Fig. 6a,b**) e normali livelli di SERCA2a (**Fig. 6c**), tuttavia senza ridurre il basso tasso di fibrosi riscontrato in topi wild-type (**Fig. 6a**). Questi dati dimostrano che la disfunzione dei recettori  $\beta$ -adrenergici è un precoce promotore della disfunzione ventricolare indipendentemente dalla risposta ipertrofica. Soprattutto, l'inibizione localizzata di PI3K previene tali anomalie e lo sviluppo di numerosi aspetti patologici indotti dal sovraccarico di pressione.

### **L'overespressione di PI3K $\gamma_{inact}$ previene le precoci anomalie funzionali in cuori del gruppo iTAC**

Per determinare le conseguenze funzionali delle precoci anomalie  $\beta$ -adrenergiche e della loro normalizzazione mediante l'overespressione di PI3K $\gamma_{inact}$ , abbiamo misurato invasivamente indici emodinamici di funzione cardiaca sistolica e diastolica in topi dei diversi gruppi mediante analisi di curve pressione-volume *in vivo* (30) (**Tabella 2**). Mentre topi SWIM esibivano normali proprietà diastoliche e sistoliche ed erano indistinguibili dai cuori di controllo (**Tabella 2** e **Fig. 7a,b**), cuori sottoposti a sovraccarico di pressione cronico o intermittente mostravano una pendenza più ripida della relazione pressione-volume telesistolica (Ees) (**Fig. 7c,e** e **Tabella 2**), suggerendo la presenza di uno stato iper-contrattile come noi ed altri hanno precedentemente dimostrato (30, 31). In questi animali, anche la funzione diastolica era severamente compromessa, con un marcato prolungamento del tempo di rilasciamento, dall'elevata pressione diastolica e da una ripida pendenza della relazione pressione-volume telediastolica (EDPVR) (**Tabella 2**). Inoltre, questi animali mostravano una ridotta risposta contrattile alla stimolazione con il  $\beta$ -agonista dobutamina *in vivo* (**Fig. 7i**). In contrasto, topi iTAC $\gamma_{inact}$  mostravano una normale funzione diastolica, ridotta ipercontrattilità

basale ed una normale risposta contrattile alla stimolazione con  $\beta$ -agonista (**Fig. 7f** e **Table 2**).

### **Il trattamento con il $\beta$ -bloccante metoprololo previene le anomalie del sistema $\beta$ AR in risposta al sovraccarico di pressione intermittente ma non la rarefazione vascolare**

Per approfondire i meccanismi mediante cui  $\text{PI3K}\gamma_{\text{inact}}$  esercitava i suoi effetti benefici e per confrontare questa nuova strategia molecolare con i  $\beta$ -bloccanti abbiamo testato gli effetti del trattamento con metoprololo sugli aspetti patologici indotti iTAC (iTAC<sub>meto</sub>, **Fig. 8a**). In questa sezione dello studio abbiamo incluso un nuovo gruppo di controllo in cui la sutura del gruppo iTAC veniva posizionata ma mai tirata (iSHAM). Come l'overespressione di  $\text{PI3K}\gamma_{\text{inact}}$ , il trattamento con metoprololo in topi iTAC preveniva la downregolazione dei  $\beta$ AR (**Fig. 8b**) e preservava la loro abilità di far generare *in vitro* cAMP in seguito alla stimolazione con ISO (**Fig. 8c**). Come mostrato in **Fig. 8d**, topi wild-type iTAC, ma non iTAC<sub>meto</sub> o iTAC $\gamma_{\text{inact}}$ , hanno mostrato un aumento significativo dei livelli totali cardiaci di cAMP. Questi risultati concordano con recenti dati sperimentali che indicano che  $\text{PI3K}\gamma$  partecipa alla costituzione di un ampio complesso multi-proteico che include la fosfodiesterasi 3B, e pertanto potrebbe modulare i livelli totali di cAMP attraverso un meccanismo indipendente dalla propria attività chinasi (32).

Successivamente abbiamo valutato gli effetti dei diversi trattamenti sulla morte cellulare apoptotica, eseguendo saggi TUNEL su sezioni cardiache da animali dei diversi gruppi. Come mostrato in **Fig. 8e,f** l'overespressione di  $\text{PI3K}\gamma_{\text{inact}}$  o il trattamento con metoprololo riduceva significativamente la % di morte apoptotica di cellule endoteliali e cardiache rispetto a topi iTAC wild-type. Nonostante questi effetti benefici, il trattamento con metoprololo non preveniva la rarefazione vascolare indotta dal protocollo iTAC (**Fig. 9a**). In accordo con i dati istologici, i livelli cardiaci del fattore angiogenetico angiopoietina 2 erano

significativamente ridotti in topi iTAC<sub>meto</sub>, ed erano simili a quelli di topi iTAC non trattati. Al contrario, in topi iTAC<sub>γ<sub>inact</sub></sub> abbiamo osservato la completa normalizzazione dei livelli cardiaci di angiopoietina 2 (**Fig. 9b**) e della densità capillare (**Fig. 6a,b**). Mentre il trattamento con metoprololo non riduceva la bassa percentuale di fibrosi interstiziale e perivascolare (**Fig. 9c**), o migliorava il tempo di rilasciamento isovolumetrico osservato in topi iTAC wild type (**Fig. 9d**), esso riduceva lo stato iper-contrattile (**Fig. 9e**) e normalizzava la pendenza della EDPVR (**Fig. 9d**). Questi dati supportano l'ipotesi che la densità vascolare e la fibrosi interstiziale potrebbero essere coinvolti nello sviluppo della precoce disfunzione diastolica dei cuori sottoposti a sovraccarico di pressione e della progressione verso lo scompenso cardiaco (33). Inoltre, i nostri dati dimostrano che una strategia basata sullo spiazzamento competitivo di PI3K da  $\beta$ ARK1 ricapitola molti degli effetti benefici della terapia con  $\beta$ -bloccanti e mostra proprietà protettive additive, possibilmente mediate da meccanismi indipendenti dalle proteine G (34, 35).

### **Stress meccanico e neuromorale promuovono le precoci anomalie dei recettori $\beta$ -adrenergici in cuori sottoposti a sovraccarico di pressione intermittente**

I nostri risultati indicano che il fenotipo maladattativo indotto dal sovraccarico di pressione intermittente si associa a precoci anomalie dei  $\beta$ AR e che la normalizzazione del signaling  $\beta$ AR previene lo sviluppo di numerose sequele patologiche. Per studiare i meccanismi responsabili dell'induzione di tali precoci segni molecolari patologici, abbiamo valutato il ruolo delle catecolammine durante la fase acuta dello stress in topi wild-type SWIM e iTAC ed in topi transgenici iTAC<sub>γ<sub>inact</sub></sub> alla fine delle sessioni di allenamento e dopo 12 h di riposo, in presenza o assenza di pre-trattamento con metoprololo (**Fig. 10**) (13, 26, 27). In tutti gli animali immediatamente dopo 90' di stress abbiamo riscontrato un simile incremento dei livelli di epinefrina e norepinefrina (**Fig. 10a,b**), che regrediva dopo 12 ore di

riposo. Come previsto, il trattamento degli animali con il  $\beta$ -bloccante metoprololo non preveniva l'attivazione neuromorale in questi animali (**Fig. 10a,b**).

Nonostante i topi dei diversi gruppi abbiano mostrato livelli plasmatici simili di epinefrina e norepinefrina (**Fig. 10a,b**), solo cuori iTAC hanno esibito anomalie del signaling  $\beta$ -adrenergico dopo soli 90' di sovraccarico di pressione intermittente. Tali anomalie regredivano dopo 12 h di riposo e potevano essere prevenute mediante trattamento con metoprololo o overespressione di PI3K $\gamma_{\text{inact}}$  (**Fig. 10c**). In questi stessi cuori, non sono stati rilevati cambiamenti significativi dei livelli di  $\beta$ AR sulla membrana plasmatica (**Fig. 10d**). Questi risultati dimostrano che entrambi i protocolli SWIM ed iTAC inducono un'intensa e simile transiente attivazione del sistema nervoso simpatico. Tuttavia, il marcato incremento della stimolazione neuromorale *in vivo* da sola non è sufficiente per indurre le marcate anomalie del sistema  $\beta$ -adrenergico riscontrabili sin dalle fasi più precoci del sovraccarico di pressione. Anche se è ignoto se lo stress meccanico, di per sé, possa alterare il signaling  $\beta$ AR come precedentemente dimostrato per i recettori dell'angiotensina II (36), noi ipotizziamo che l'integrazione dei segnali neuromorali e biomeccanici sia necessaria per indurre disfunzione  $\beta$ -adrenergica nei cuori sottoposti a sovraccarico di pressione intermittente.



## Discussione

In questo studio abbiamo investigato il ruolo della natura dello stress, o della sua durata nello sviluppo di un fenotipo patologico o fisiologico cardiaco. I nostri risultati dimostrano che la durata del sovraccarico cardiaco determina l'entità della risposta ipertrofica e la ri-espressione di geni fetali, mentre la natura del sovraccarico determina il fenotipo, cioè se l'ipertrofia è fisiologica o patologica. Infatti, il sovraccarico di pressione intermittente determina l'attivazione cronica di segnali intracellulari associati a profonde anomalie istologiche e cellulari nonostante un fenotipo apparentemente fisiologico di lieve ipertrofia ventricolare, conservata funzione contrattile ventricolare e l'assenza di ri-espressione di geni fetali. Inoltre, i nostri dati dimostrano che la combinazione di eccessiva attivazione neuromorale ed aumentato stress bio-meccanico promuove precoci anomalie del sistema  $\beta$ AR. Infine, una strategia molecolare che altera la sintesi locale di fosfatidil-inositoli da parte di PI3K nell'ambito del  $\beta$ AR, può prevenire molte anomalie strutturali e funzionali indotte dal sovraccarico di pressione senza esercitare alcun effetto sulla risposta ipertrofica cardiaca.

Il meccanismo con cui il cuore interpreta e distingue stress di diversa natura producendo diversi fenotipi resta sconosciuto. In contrasto con l'ipotesi che la durata dello stress svolge un ruolo chiave in questo processo, noi proponiamo un nuovo concetto che la natura patologica del sovraccarico cardiaco determina le caratteristiche molecolari, funzionali e strutturali del fenotipo patologico. In questo studio dimostriamo che l'entità della risposta ipertrofica e la ri-espressione di geni fetali è direttamente proporzionale alla durata dello stress. Infatti, topi sottoposti allo stesso stress patologico, intermittenemente (iTAC) o cronicamente (cTAC), differiscono significativamente per l'entità della risposta ipertrofica e dell'espressione di geni fetali. In contrasto, topi sottoposti a sovraccarichi di tipo fisiologico o patologico per uno stesso intervallo di tempo (SWIM e iTAC) hanno mostrato un simile profilo genetico. Mentre dati recenti indicano che la ri-espressione di geni fetali può essere dissociata dallo sviluppo di ipertrofia ventricolare (3), essa di solito si associa al fenotipo

patologico (21, 37). I nostri dati suggeriscono che mentre l'espressione di geni fetali rappresenta un utile marker in condizioni chiaramente patologiche (21, 37) e potenzialmente potrebbe essere usata per monitorare l'efficacia della terapia farmacologica nello scompenso cardiaco (38), la sua assenza non indica necessariamente un fenotipo fisiologico. In questo studio dimostriamo che marcate anomalie strutturali e funzionali esistono in cuori iTAC in assenza di anomalie significative dell'espressione di geni critici quali  $\beta$ MHC, ANP or BNP. Questi dati indicano che il sovraccarico cardiaco viene trasmesso a livello nucleare solo quando lo stress è applicato cronicamente. Pertanto, un profilo di espressione genica favorevole di un cuore lievemente ipertrofico può coesistere con segnali molecolari che conducono ad un fenotipo francamente patologico.

Numerosi segnali intracellulari attivati dal sovraccarico cardiaco sono coinvolti nello sviluppo della risposta ipertrofica del ventricolo sinistro, sia essa fisiologica o patologica (39). Anche se l'aumento della massa cardiaca è ormai riconosciuto come un fattore di rischio cardiovascolare indipendente, il suo ruolo specifico è incerto, poiché l'inibizione dell'ipertrofia cardiaca può esercitare sia effetti benefici (4) sia effetti avversi (8-12). Inoltre, la risposta ipertrofica non sempre svolge un ruolo patologico, ed infatti in alcune condizioni la sua inibizione riduce la contrattilità cardiaca (15, 40). Mentre non possiamo escludere che la lieve risposta ipertrofica vista dopo 4 settimane di iTAC potrebbe essere importante per preservare la funzione cardiaca in risposta agli incrementi intermittenti di post-carico, i nostri risultati a breve termine indicano che l'attivazione di segnali molecolari patologici può essere dissociata dall'induzione di ipertrofia ventricolare. Infatti, nel nostro studio abbiamo osservato anomalie molecolari dopo solo 7 giorni di sovraccarico di pressione intermittente, quando non era ancora rivelabile un significativo aumento della massa ventricolare sinistra. Inoltre, in animali sottoposti a stress fisiologici o patologici della stessa durata abbiamo osservato simili livelli di ipertrofia ventricolare. Questi dati suggeriscono che la risposta ipertrofica per sé potrebbe non essere critica nello sviluppo di scompenso cardiaco come

attualmente si crede (3, 6, 7). In contrasto, l'impronta molecolare del cuore sottoposto a stress patologici, non la sua massa, è un importante predittore di disfunzione ventricolare.

In questo studio dimostriamo che anomalie del sistema  $\beta$ -adrenergico si verificano precocemente in risposta a stress patologici. In accordo con studi precedenti, nei nostri cuori abbiamo riscontrato che l'aumento dei livelli di  $\beta$ ARK1 è uno degli eventi più precoci nello sviluppo di disfunzione  $\beta$ -adrenergica (23). Il nostro studio dimostra che i meccanismi coinvolti nello sviluppo di anomalie del sistema  $\beta$ AR sono indipendenti da quelli responsabili dell' induzione di ipertrofia cellulare, poichè dopo una settimana di iTAC non abbiamo osservato alcuna risposta ipertrofica nonostante un fenotipo molecolare, istologico e funzionale marcatamente patologico. Sebbene sia opinione comune che gli aumentati livelli di catecolamine circolanti nello scompenso cardiaco umano siano gli unici responsabili della disfunzione  $\beta$ AR, il nostro studio dimostra che l'esercizio fisico o un transiente sovraccarico di pressione producono una simile ed intensa attivazione neuromorale, ma solo il sovraccarico di pressione determina desensibilizzazione e downregolazione dei recettori  $\beta$ AR. Questi risultati suggeriscono che nell'induzione delle anomalie del sistema adrenergico è necessario un aumento combinato di stress neuromorale e biomeccanico. Mentre non è noto se i recettori  $\beta$ AR possano funzionare come sensori dello stress meccanico come è stato recentemente dimostrato per il recettore dell' angiotensina II di tipo 1 (36), noi ipotizziamo che l'integrazione intracellulare di stimoli neuromorali e biomeccanici promuova l'attivazione di distinti pathway molecolari determinanti specifici fenotipi. Studi futuri saranno necessari per chiarire il ruolo dei diversi sottotipi di recettori  $\beta$ -adrenergici e dei recettori dell'angiotensina II nello sviluppo di scompenso cardiaco.

Il nostro studio dimostra che la normalizzazione del signaling  $\beta$ AR mediante una strategia di spiazzamento competitivo di PI3K da  $\beta$ ARK1 previene numerose caratteristiche patologiche indotte dal protocollo iTAC senza esercitare alcun effetto sulla risposta

ipertrofica. Questi risultati concordano con recenti studi effettuati nel nostro laboratorio che mostrano come la ridotta sintesi locale di fosfatidil-inositoli da parte dell'enzima PI3K in prossimità del  $\beta$ AR preserva il signaling  $\beta$ -adrenergico e migliora la disfunzione ventricolare in numerosi modelli animali di scompenso cardiaco (13, 26, 27). In seguito alla normalizzazione del sistema  $\beta$ AR, questo nostro nuovo approccio molecolare previene numerose sequele patologiche indotte dal sovraccarico di pressione, con un meccanismo simile a quello del  $\beta$ -bloccante metoprololo. Sorprendentemente, pur esercitare numerosi effetti benefici in risposta al sovraccarico di pressione intermittente, il trattamento con metoprololo non preservava la densità vascolare o la velocità di rilasciamento isovolumetrico in topi iTAC. Mentre è ben noto che i  $\beta$ -bloccanti possono aumentare la velocità di rilasciamento isovolumetrico nel cuore (41, 42), i nostri risultati dimostrano che il meccanismo responsabile della rarefazione vascolare in risposta al sovraccarico di pressione sembra essere indipendente dalla stimolazione con catecolammine dei recettori  $\beta$ -adrenergici, poiché tale aspetto patologico non è stato normalizzato dalla terapia con metoprololo. Inoltre, questi dati suggeriscono che lo spiazzamento competitivo di PI3K dal complesso con  $\beta$ ARK1 può esercitare effetti benefici con meccanismi indipendenti dall'accoppiamento tra  $\beta$ AR e Gs (13, 24, 26, 27) e dai livelli di cAMP (32, 43), forse mediante l'attivazione di segnali intracellulari protettivi indipendenti dalle proteine G (34, 35).

Classicamente, i recettori  $\beta$ -adrenergici transducono i segnali extracellulari attraverso le proteine G eterotrimeriche, anche se studi recenti hanno suggerito che alcuni aspetti del signaling adrenergico possano svolgersi indipendentemente dall'attivazione delle proteine G (34, 35). I principali regolatori di queste funzioni indipendenti dalle proteine G sembrano essere le chinasi GRKs (G protein-coupled receptor kinases, di cui  $\beta$ ARK1 è un membro) e le  $\beta$ -arrestine. Anche se l'azione sequenziale delle GRKs e delle  $\beta$ -arrestine determina l'esaurimento dei segnali recettoriali, un processo noto come desensibilizzazione

(24), dati recenti suggeriscono che le GRKs e le  $\beta$ -arrestine siano anche coinvolte nella trasduzione di segnali indipendentemente dalle proteine G (35). Studi recenti effettuati nel nostro laboratorio hanno precedentemente dimostrato che l'overespressione di PI3K $\gamma_{inact}$  non ostacola la traslocazione alla membrana sia di  $\beta$ ARK1, sia delle  $\beta$ -arrestine (44, 45). La normalizzazione della densità vascolare in topi iTAC $\gamma_{inact}$ , ma non in topi iTAC trattati con  $\beta$ -bloccanti suggerisce che l'attivazione di segnali mediati dalle  $\beta$ -arrestine possa essere un potenziale meccanismo di questo effetto benefico.

Anche se studi precedenti e questo indicano che l'isoforma  $\gamma$  di PI3K sia selettivamente attivata dagli stress patologici, è stato precedentemente dimostrato in topi knockout per tale isoforma che l'assenza della sola PI3K $\gamma$  non è sufficiente per preservare il signaling  $\beta$ -adrenergico in risposta alla cronica stimolazione con catecolammine (13) o per migliorare la funzione cardiaca in risposta al sovraccarico di pressione (32). Questi risultati concordano con la nostra ipotesi che per prevenire la disfunzione  $\beta$ -recettoriale è necessario lo spiazzamento competitivo di tutte isoforme dell'enzima PI3K, piuttosto che l'inibizione di una specifica isoforma. Infatti, il dominio di legame con  $\beta$ ARK1 è condiviso da tutte le isoforme di PI3K e pertanto in seguito all'eliminazione di un isoforma altre cataliticamente attive potrebbero essere traslocate in prossimità del  $\beta$ -recettore.

In accordo con i nostri risultati, aumenti transienti della pressione arteriosa che si verificano in pazienti affetti da apnee notturne (obstructive sleep apnea, OSA) (46), sono associati con un graduale deterioramento della funzione diastolica del ventricolo sinistro (47) e da un aumentato rischio di malattie cardiovascolari, anche normalizzato i dati per molteplici fattori di rischio coesistenti (48).

In conclusione, questo studio dimostra che l'ipertrofia cardiaca è una risposta generale e tempo-dipendente allo stress cardiaco, a dispetto del sottostante fenotipo molecolare, strutturale e funzionale. Il sovraccarico di pressione intermittente induce una precoce

transizione dei cardiomiociti verso lo scompenso cardiaco pur senza indurre un marcata risposta ipertrofica. La normalizzazione del signaling  $\beta$ -adrenergico mediante una strategia molecolare che previene la traslocazione di PI3K in prossimità del  $\beta$ -recettore previene numerose sequele patologiche indotte dal sovraccarico di pressione.

## Legende delle Figure

### Figura 1

**(a)** Disegno sperimentale dello studio a 4 settimane coinvolgente diversi modelli di ipertrofia fisiologica (SWIM, RUN) o sovraccarico di pressione, cronico (cTAC) o intermittente (iTAC). Topi sedentari o con operazione SHAM sono stati usati come controllo per i gruppi SWIM/RUN e iTAC/cTAC, rispettivamente e sono mostrati come un unico gruppo (CON). **(b)** Registarzioni rappresentative delle pressioni arteriose invasive nell'arteria carotide comune destra e nell'arteria succlavia sinistra in topi iTAC (panello a sinistra) e cTAC (panello a destra). In tutti i topi iTAC inclusi nello studio, tiro la sutura esternalizzata si determinava un rapido aumento della pressione sistolica nell'arteria prossimale (carotide destra), con o senza una diminuzione della pressione nell'arteria distale (succlavia sinistra). Il gradiente regrediva rapidamente dopo il rilascio della sutura. **(c)** LV/BW in topi dei diversi gruppi (\* $p < 0.05$  vs. CON; † $p < 0.01$ , cTAC vs. tutti, ANOVA con correzione di Neuman-Keuls); **(d)** LV/BW rapportato al gradiente di pressione sistolica misurato al sacrificio in topi iTAC e cTAC; **(e)** Ecocardiogrammi rappresentativi di topi dei diversi gruppi dopo 4 settimane di trattamento; **(f)** % FS in topi dei diversi gruppi dopo 4 settimane di trattamento († $p < 0.01$ , cTAC vs. tutti, ANOVA con correzione di Bonferroni); **(g)** % FS rapportato al gradiente di pressione sistolica misurato al sacrificio in topi iTAC e cTAC. Abbreviazioni: LV, peso del ventricolo sinistro; BW, peso corporeo; SPG, gradiente di pressione sistolica; % FS, % frazione di accorciamento.

### Figura 2

**(a)** Espressione genica della renina in reni di topi SWIM, RUN, iTAC e cTAC analizzata con RT-PCR. I dati sono mostrati come incremento rispetto ai valori dei controlli CON/SHAM  $\pm$  SEM (non significativo). **(b-c)** Espressione genica delle isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  della catena pesante della miosina (MHC), fattore natriuretico atriale (ANP), peptide natriuretico cerebrale (BNP),

recettore dell' angiotensina-1 (ATR), adrenomedullina (AM) e del recettore A del fattore natriuretico atriale (NPRA) in cuori di topi SWIM, iTAC e cTAC analizzata mediante real-time RT-PCR. Topi sedentary sono stati usati come controlli per i topi SWIM, mentre topi SHAM sono stati usati come controllo per i gruppi iTAC o cTAC. I dati sono mostrati come incremento rispetto ai valori dei controlli CON/SHAM  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$  per cTAC vs. SWIM; † $p < 0.01$  per cTAC vs. iTAC, t-test).

### Figura 3

**(a)** Immagini rappresentative di sezioni cardiache colorate con ematossilina-eosina (HE, ingrandimento 400X), Masson Tricromica (MT, 20X) e fosfatasi alcalina endoteliale (densità capillare, CD, 400X). **(b)** Quantificazione della densità capillare in sezioni cardiache espressa come % di capillari rispetto al CON (\* $p < 0.01$  vs. CON, ANOVA con correzione di Bonferroni). **(c)** Dati cumulativi degli studi di contrattilità condotti su cardiomiociti isolati da cuori CON, SWIM, iTAC e cTAC dopo 4 settimane ( $n=5-10$  topi/gruppo; in ogni cuore, sono state analizzate 10-15 cellule in condizioni basali e dopo stimolazione con isoproterenolo). % Accorciamento Cellulare (%CS) in condizioni basali (colonne bianche) e dopo stimolazione con isoproterenolo (ISO, colonne nere; \* $p < 0.01$ , ISO vs. rispettivo basale, † $p < 0.01$  vs. corrispondente CON o SWIM, ANOVA con correzione di Neuman-Keuls).

### Figura 4

**(a)** Densità dei  $\beta$ AR sulle membrane plasmatiche isolate da cuori CON ( $n=17$ ), SWIM ( $n=7$ ), RUN ( $n=9$ ), iTAC ( $n=7$ ), cTAC ( $n=11$ ), † $p < 0.01$ , iTAC o cTAC vs. CON. **(b)** Attività dell' adenilato ciclasi in condizioni di base (colonne bianche) e dopo stimolazione con isoproterenolo (ISO, colonne nere) in membrane plasmatiche isolate da cuori CON ( $n=15$ ), SWIM ( $n=9$ ), RUN ( $n=7$ ), iTAC ( $n=6$ ), cTAC ( $n=9$ ) (\* $p < 0.01$ , ISO vs. rispettivo basale e † $p < 0.01$ , iTAC ISO o cTAC ISO vs. CON ISO, ANOVA con correzione di Bonferroni). **(c)**



Livelli di  $\beta$ ARK1 in lisati miocardici (80  $\mu$ g) di cuori CON, SWIM, RUN, iTAC e cTAC, insieme alla proteina purificata (+). **(d)** Saggio rappresentativo di attività di PI3K associate a  $\beta$ ARK1 in lisati di membrane ottenuti da cuori CON, SWIM, RUN, iTAC, cTAC (pannello sinistro). I dati cumulativi di tutti gli esperimenti eseguiti (n=4-7 cuori/gruppo) sono mostrati a destra ( $\dagger p < 0.01$ , iTAC o cTAC vs. CON, t-test con correzione di Bonferroni). **(e)** Dati cumulativi dell'attività di PI3K $\gamma$  in estratti citosolici degli stessi cuori ( $\dagger p < 0.01$ , iTAC o cTAC vs. CON, t-test con correzione di Bonferroni). **(f)** Dati cumulativi dell'attività di PI3K $\alpha$  in estratti citosolici degli stessi cuori ( $\dagger p < 0.01$ , SWIM o RUN vs. CON, t-test con correzione di Bonferroni). Abbreviazioni:  $\beta$ AR, recettori  $\beta$ -adrenergici;  $\beta$ ARK1,  $\beta$ AR chinasi 1; PI3K, fosfoinositolo 3-chinasi; Ori, origine; PIP, fosfatidilinositolo-bi-fosfato; PIP2.

## Figura 5

**(a)** Disegno sperimentale dello studio ad 1 settimana coinvolgente topi WT e PI3K $\gamma_{inact}$ ; **(b)** LV/BW in topi dei diversi gruppi ( $*p < 0.01$ , cTAC vs. tutti, ANOVA con correzione di Bonferroni); **(c)** LV/BW rapportato al rispettivo gradiente sistolico misurato al termine dello studio in topi iTAC, iTAC $\gamma_{inact}$  e cTAC. Livelli plasmatici delle catecolamine norepinefrina **(d)** ed epinefrina **(e)** nei diversi gruppi ( $*p < 0.01$  vs. CON). **(f)** Densità dei  $\beta$ AR in membrane cardiache di topi CON (n=12), iTAC (n=10), iTAC $\gamma_{inact}$  (n=9) e cTAC (n=11) ( $\dagger p < 0.01$ , iTAC o cTAC vs. CON o iTAC $\gamma_{inact}$ , ANOVA con correzione di Bonferroni).

## Figura 6

**(a)** Immagini rappresentative di sezioni cardiache colorate con ematossilina-eosina (HE, ingrandimento 400X), Masson Tricromica (MT, 20X) e fosfatasi alcalina endoteliale (densità capillare, CD, 400X) in cuori dopo 1 settimana di trattamento. **(b)** Quantificazione della densità capillare in sezioni cardiache espressa come % di capillari rispetto al CON (n=4-6

cuori/gruppo,  $*p < 0.01$  vs. CON, SWIM e iTAC $\gamma_{inact}$ , t-test con correzione di Bonferroni). **(c)** Livelli proteici di SERCA2a, actina e PI3K $\gamma_{inact}$  in cuori dopo 1 settimana di trattamento. La quantizzazione densitometrica dei livelli di SERCA2a è mostrata nel pannello inferiore (n=6-10 cuori/gruppo;  $*p < 0.05$  vs. CON,  $\dagger p < 0.05$  vs. iTAC, ANOVA con correzione di Neuman-Keuls).

### Figura 7

Curve pressione-volume rappresentative ottenute tirando gentilmente la nuova sutura posizionata intorno all'aorta trasversa in topi CON **(a)**, SWIM **(b)**, iTAC **(c)**, iTAC $\gamma_{inact}$  **(d)** e cTAC **(e)** mice dopo 1 settimana di stress. **(f)**  $\Delta P/dt$  Max in topi CON (n=11), SWIM (n=9), iTAC (n = 9), iTAC $\gamma_{inact}$  (n = 9), e cTAC (n = 15) in seguito a dosi incrementali (3 min) di dobutamina (1, 2 e 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $*p < 0.05$  vs. CON (t-test con correzione di Bonferroni).

### Figura 8

**(a)** Study Design III. **(b)** Densità dei  $\beta$ AR sulle membrane plasmatiche isolate da cuori iSHAM (n=6), iTAC (n=6), iTAC<sub>meto</sub> (n=6), e iTAC $\gamma_{inact}$  (n=6).  $*p < 0.01$  vs. iSHAM. **(c)** Attività dell' adenilato ciclasi in condizioni di base (colonne bianche) e dopo stimolazione con isoproterenolo (ISO, colonne nere) ( $*p < 0.01$ , ISO vs. rispettivo basale e  $\dagger p < 0.01$  vs. iSHAM ISO, ANOVA con correzione di Bonferroni). **(d)** Concentrazione intracellulare di cAMP in lisati cellulari totali di cuori dei diversi gruppi,  $*p < 0.01$  vs. iSHAM. Sezioni rappresentative di TUNEL **(e)** e dati cumulativi di numerosi esperimenti indipendenti **(f)**,  $*p < 0.01$  vs. iSHAM.

### Figura 9

**(a)** Immagini rappresentative di sezioni cardiache colorate con fosfatasi alcalina endoteliale (400 X) e dati cumulativi of diversi esperimenti independent ( $*p < 0.01$  vs. iSHAM). **(b)**

Livelli cardiaci di angiopoietina 2 (Ang-2, pannello superiore) e relativa analisi densitometrica e statistica di numerosi esperimenti indipendenti (\* $p < 0.05$  vs. iSHAM). **(c)** % area di fibrosi in cuori dei diversi gruppi studiati (\* $p < 0.01$  vs. tutti gli altri gruppi). Dati cumulative relativi a  $\tau$  Glantz **(d)**, Ees **(e)**, e la pendenza della relazione pressione-volume telediastolica (EDPVR) **(f)**, \* $p < 0.05$  vs CON, t-test con correzione di Bonferroni.

### **Figura 10**

Livelli plasmatici delle catecolammine epinefrina **(a)** e norepinefrina **(b)**, sintesi in vitro di cAMP **(c)** e densità dei  $\beta$ AR **(d)** in membrane cardiache ottenute da cui espantati immediatamente al termine della sessione di nuoto o iTAC o dopo 12 h di riposo, in presenza o assenza di pre-trattamento con metoprololo(\* $p < 0.01$  vs. CON).

**Tabella 1 Valutazione ecocardiografica e morfometrica di cuori ipertrofici dopo 4 settimane (Study Design I)**

	CON	SWIM	RUN	iTAC	cTAC
<i><b>Ecocardiografia</b></i>	<b>n = 15</b>	<b>n = 16</b>	<b>n = 19</b>	<b>n = 24</b>	<b>n = 29</b>
<b>LVEDD, mm</b>	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1*	2.9 ± 0.1*	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1*
<b>LVESD, mm</b>	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1†
<b>IVS, mm</b>	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1*	1.1 ± 0.1*
<b>PW, mm</b>	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1*	1.1 ± 0.1*
<b>FS, %</b>	61.5 ± 1.5	59.9 ± 1.5	61.8 ± 1.1	60.6 ± 1.4	43.4 ± 1.8†
<b>Vcfc, circ/s</b>	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	3.2 ± 0.1†
<b>Frequenza cardiaca, bpm</b>	642.9 ± 10.4	565.5 ± 13.3†	621.9 ± 9.1	646.1 ± 7.5	635.7 ± 7.4
<i><b>Morfometria di Organi</b></i>	<b>n = 22</b>	<b>n = 21</b>	<b>n = 25</b>	<b>n = 17</b>	<b>n = 23</b>
<b>BW, g</b>	21.0 ± 0.3	19.2 ± 0.3	21.3 ± 0.2	21.0 ± 0.6	20.7 ± 0.3
<b>LA, mg</b>	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	5.2 ± 0.4*	8.7 ± 1.2†
<b>LVW/BW, mg/g</b>	3.3 ± 0.03	3.9 ± 0.06*	3.8 ± 0.05*	3.7 ± 0.07*	6.0 ± 0.25†
<b>HW/BW, mg/g</b>	4.6 ± 0.03	5.2 ± 0.05*	5.1 ± 0.05*	4.9 ± 0.10*	7.4 ± 0.31†
<b>Peso Polmone/BW, mg/g</b>	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.3	7.0 ± 0.1	8.4 ± 0.5*	10.5 ± 0.8†
<i><b>Morfometria Cellulare</b></i>	<b>n = 6</b>	<b>n = 6</b>		<b>n = 4</b>	<b>n = 8</b>
<b>CM spessore, µm</b>	21.1 ± 0.5	23.4 ± 0.9	-	25.0 ± 0.5*	25.1 ± 0.9*
<b>CM area, µm<sup>2</sup></b>	2286.7 ± 61.5	2609.0 ± 68.5*	-	2599.7 ± 68.8*	2801.9 ± 88.1*

LV, ventricolo sinistro; LVEDD, diametro tele-diastolico LV; LVESD, diametro tele-sistolico LV; IVS, setto interventricolare; PW, parete posteriore; FS, frazione di accorciamento; Vcfc, frazione di accorciamento circonferenziale, corretto per la frequenza cardiaca; BW, peso corporeo; LA, atrio sinistro; HW, peso del cuore; CM, cardiomiociti. \*p<0.01 vs. CON; †p<0.001 vs. tutti gli altri gruppi (ANOVA con correzione di Neuman-Keuls per ecocardiografia e morfometria di organi; t-test con correzione di Bonferroni per la morfometria cellulare.

**Tabella 2 Parametri fisiologici basali e dopo variazione del postcarico in topi dopo 1 settimana di trattamento (Study Design II)**

	<b>CON n = 11</b>	<b>SWIM N =9</b>	<b>iTAC n =9</b>	<b>iTAC<math>\gamma_{inact}</math> n = 9</b>	<b>cTAC n = 15</b>
<b>Frequenza cardiaca, bpm</b>	316.3 $\pm$ 16.7	298 $\pm$ 8.4	291.6 $\pm$ 14.0	321.2 $\pm$ 27.8	287.0 $\pm$ 10.6
<b>LVEDD, mm</b>	2.6 $\pm$ 0.05	-	2.6 $\pm$ 0.06	2.6 $\pm$ 0.04	2.8 $\pm$ 0.08
<b>IVS, mm</b>	0.7 $\pm$ 0.02	-	0.9 $\pm$ 0.04*	0.9 $\pm$ 0.02*	1.0 $\pm$ 0.08*
<b>PW, mm</b>	0.6 $\pm$ 0.01	-	0.8 $\pm$ 0.03*	0.8 $\pm$ 0.03*	0.9 $\pm$ 0.06*
<b>FS, %</b>	63.9 $\pm$ 1.3	-	64.9 $\pm$ 1.6	67.0 $\pm$ 1.1	52.2 $\pm$ 2.5
<b>ESV, <math>\mu</math>l</b>	15.4 $\pm$ 2.2	16.7 $\pm$ 1.6	21.5 $\pm$ 3.0	12.9 $\pm$ 1.0	19.4 $\pm$ 2.1
<b>EDV, <math>\mu</math>l</b>	36.8 $\pm$ 2.2	37.8 $\pm$ 1.9	39.8 $\pm$ 3.1	37.9 $\pm$ 3.2	38.2 $\pm$ 2.6
<b>Ea, mmHg/<math>\mu</math>l</b>	3.9 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.3
<i>Systolic Function</i>					
<b>Max Press, mmHg</b>	96.7 $\pm$ 3.2	89.9 $\pm$ 5.5	81.3 $\pm$ 5.0	98.1 $\pm$ 6.4	89.7 $\pm$ 3.2
<b>ESP, mmHg</b>	89.8 $\pm$ 3.9	83.5 $\pm$ 6.0	75.0 $\pm$ 4.8	87.9 $\pm$ 5.9	76.2 $\pm$ 3.4
<b>dP/dtmax, mmHg/sec</b>	7011 $\pm$ 333	5979 $\pm$ 309	4025 $\pm$ 234*	4532 $\pm$ 215*	5275 $\pm$ 280*
<b>EF, %</b>	65.0 $\pm$ 3.3	60.2 $\pm$ 1.7	50.8 $\pm$ 5.8	67.8 $\pm$ 1.9†	56.6 $\pm$ 3.8
<b>SV, <math>\mu</math>l</b>	24.2 $\pm$ 1.6	23.7 $\pm$ 0.8	21.2 $\pm$ 3.1	28.2 $\pm$ 2.3	23.6 $\pm$ 1.9
<b>CO, ml/min</b>	7.6 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.9	8.3 $\pm$ 0.7†	6.5 $\pm$ 0.6
<b>Ees, mmHg/<math>\mu</math>l</b>	4.1 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.8*	5.3 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.9*
<i>Diastolic Function</i>					
<b>EDP, mmHg</b>	8.2 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.7	18.7 $\pm$ 3.0*	12.8 $\pm$ 2.3	13.9 $\pm$ 1.2*
<b>dP/dtmin, mmHg/sec</b>	-5571 $\pm$ 201	-4750 $\pm$ 282	-3259 $\pm$ 426*	-3324 $\pm$ 271*	-3292 $\pm$ 260*
<b><math>\tau</math> (Glantz), msec</b>	22.6 $\pm$ 0.7	25.2 $\pm$ 1.2	33.0 $\pm$ 2.8*	21.7 $\pm$ 1.7†	38.5 $\pm$ 3.8*
<b>EDPVR, mmHg/<math>\mu</math>l</b>	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3*	0.4 $\pm$ 0.1†	0.9 $\pm$ 0.1*

ESV, volume tele-sistolico; EDV, volume tele-diastolico; Ea, elastanza; ESP, pressione tele-sistolica; EF, frazione di eiezione; SV, gittata sistolica; CO, gittata cardiaca; EDP, pressione tele-diastolica; EDPVR, relazione pressione-volume tele-diastolica. \*p<0.05 vs. CON e †p<0.05 vs. iTAC (t-test con correzione di Bonferroni).

## Referenze

1. Meerson, F.Z. 1962. Compensatory hyperfunction of the heart e cardiac insufficiency. *Circ Res* 10:250-258.
2. Levy, D., Garrison, R.J., Savage, D.D., Kannel, W.B., e Castelli, W.P. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322:1561-1566.
3. Frey, N., Katus, H.A., Olson, E.N., e Hill, J.A. 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580-1589.
4. Esposito, G., Rapacciuolo, A., Naga Prasad, S.V., Takaoka, H., Thomas, S.A., Koch, W.J., e Rockman, H.A. 2002. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105:85-92.
5. Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., e Dagenais, G. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145-153.
6. Devereux, R.B., Wachtell, K., Gerdts, E., Boman, K., Nieminen, M.S., Papademetriou, V., Rokkedal, J., Harris, K., Aurup, P., e Dahlof, B. 2004. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *Jama* 292:2350-2356.
7. Gardin, J.M., e Lauer, M.S. 2004. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *Jama* 292:2396-2398.
8. Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., Ihling, C., Zeiher, A.M., e Dimmeler, S. 2002. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta e induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest* 109:373-381.
9. Brancaccio, M., Fratta, L., Notte, A., Hirsch, E., Poulet, R., Guazzone, S., De Acetis, M., Vecchione, C., Marino, G., Altruda, F., et al. 2003. Melusin, a muscle-specific integrin

beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nat Med* 9:68-75.

10. Hirota, H., Chen, J., Betz, U.A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., Jr., Muller, W., e Chien, K.R. 1999. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 97:189-198.
11. Meguro, T., Hong, C., Asai, K., Takagi, G., McKinsey, T.A., Olson, E.N., e Vatner, S.F. 1999. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation e heart failure. *Circ Res* 84:735-740.
12. Rogers, J.H., Tamirisa, P., Kovacs, A., Weinheimer, C., Courtois, M., Blumer, K.J., Kelly, D.P., e Muslin, A.J. 1999. RGS4 causes increased mortality e reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *J Clin Invest* 104:567-576.
13. Nienaber, J.J., Tachibana, H., Naga Prasad, S.V., Esposito, G., Wu, D., Mao, L., e Rockman, H.A. 2003. Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function e ameliorates pressure overload heart failure. *J Clin Invest* 112:1067-1079.
14. Tachibana, H., Naga Prasad, S.V., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., e Rockman, H.A. 2005. Level of {beta}-Adrenergic Receptor Kinase 1 Inhibition Determines Degree of Cardiac Dysfunction After Chronic Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Circulation* 111:591-597.
15. McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., e Izumo, S. 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12355-12360.
16. Akimoto, T., Ribar, T.J., Williams, R.S., e Yan, Z. 2004. Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1311-1319.

17. Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J., Jr., e Chien, K.R. 1991. Segregation of atrial-specific e inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8277-8281.
18. Rapacciuolo, A., Esposito, G., Caron, K., Mao, L., Thomas, S.A., e Rockman, H.A. 2001. Important role of endogenous norepinephrine e epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 38:876-882.
19. Christensen, N.J., e Galbo, H. 1983. Sympathetic nervous activity during exercise. *Annu Rev Physiol* 45:139-153.
20. Liang, C., Tuttle, R.R., Hood, W.B., Jr., e Gavras, H. 1979. Conditioning effects of chronic infusions of dobutamine. Comparison with exercise training. *J Clin Invest* 64:613-619.
21. Lowes, B.D., Minobe, W., Abraham, W.T., Rizeq, M.N., Bohlmeyer, T.J., Quaipe, R.A., Roden, R.L., Dutcher, D.L., Robertson, A.D., Voelkel, N.F., et al. 1997. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 100:2315-2324.
22. Nakao, K., Minobe, W., Roden, R., Bristow, M.R., e Leinwe, L.A. 1997. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* 100:2362-2370.
23. Cho, M.C., Rapacciuolo, A., Koch, W.J., Kobayashi, Y., Jones, L.R., e Rockman, H.A. 1999. Defective beta-adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with calsequestrin overexpression. *J Biol Chem* 274:22251-22256.
24. Rockman, H.A., Koch, W.J., e Lefkowitz, R.J. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors e heart function. *Nature* 415:206-212.
25. Choi, D.J., Koch, W.J., Hunter, J.J., e Rockman, H.A. 1997. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272:17223-17229.



26. Perrino, C., Naga Prasad, S.V., Patel, M., Wolf, M.J., e Rockman, H.A. 2005. Targeted inhibition of beta-adrenergic receptor kinase-1-associated phosphoinositide-3 kinase activity preserves beta-adrenergic receptor signaling e prolongs survival in heart failure induced by calsequestrin overexpression. *J Am Coll Cardiol* 45:1862-1870.
27. Perrino, C., Naga Prasad, S.V., Schroder, J.N., Hata, J.A., Milano, C., e Rockman, H.A. 2005. Restoration of beta-adrenergic receptor signaling e contractile function in heart failure by disruption of the betaARK1/phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation* 111:2579-2587.
28. Sadoshima, J., Montagne, O., Wang, Q., Yang, G., Warden, J., Liu, J., Takagi, G., Karoor, V., Hong, C., Johnson, G.L., et al. 2002. The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 110:271-279.
29. Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G.E., Belaguli, N.S., Yamada, M., Schwartz, R.J., Michael, L.H., Overbeek, P.A., e Schneider, M.D. 2000. TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload e is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat Med* 6:556-563.
30. Takaoka, H., Esposito, G., Mao, L., Suga, H., e Rockman, H.A. 2002. Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H2190-2197.
31. Sasayama, S., Franklin, D., e Ross, J., Jr. 1977. Hyperfunction with normal inotropic state of the hypertrophied left ventricle. *Am J Physiol* 232:H418-425.
32. Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., et al. 2004. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent e -independent effects. *Cell* 118:375-387.

33. Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., e Walsh, K. 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy e angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115:2108-2118.
34. Lefkowitz, R.J., e Shenoy, S.K. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-517.
35. Rajagopal, K., Lefkowitz, R.J., e Rockman, H.A. 2005. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* 115:2971-2974.
36. Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., et al. 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol* 6:499-506.
37. Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M.R., e Leinwe, L.A. 2000. Myosin heavy chain isoform expression in the failing e nonfailing human heart. *Circ Res* 86:386-390.
38. Lowes, B.D., Gilbert, E.M., Abraham, W.T., Minobe, W.A., Larrabee, P., Ferguson, D., Wolfel, E.E., Lindenfeld, J., Tsvetkova, T., Robertson, A.D., et al. 2002. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 346:1357-1365.
39. Dorn, G.W., 2nd, e Force, T. 2005. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115:527-537.
40. Bueno, O.F., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Jones, S.P., Lefer, D.J., Peng, C.F., et al. 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J* 19:6341-6350.
41. Frederiksen, J.W., Weiss, J.L., e Weisfeldt, M.L. 1978. Time constant of isovolumic pressure fall: determinants in the working left ventricle. *Am J Physiol* 235:H701-706.

42. Gaasch, W.H., Blaustein, A.S., Erias, C.W., Donahue, R.P., e Avitall, B. 1980. Myocardial relaxation. II. Hemodynamic determinants of rate of left ventricular isovolumic pressure decline. *Am J Physiol* 239:H1-6.
43. Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., et al. 2002. Regulation of myocardial contractility e cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110:737-749.
44. Naga Prasad, S.V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A., e Rockman, H.A. 2005. Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 7:785-796.
45. Naga Prasad, S.V., Laporte, S.A., Chamberlain, D., Caron, M.G., Barak, L., e Rockman, H.A. 2002. Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 158:563-575.
46. Somers, V.K., Dyken, M.E., Clary, M.P., e Abboud, F.M. 1995. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 96:1897-1904.
47. Kraiczi, H., Caidahl, K., Samuelsson, A., Peker, Y., e Hedner, J. 2001. Impairment of vascular endothelial function e left ventricular filling: association with the severity of apnea-induced hypoxemia during sleep. *Chest* 119:1085-1091.
48. Shahar, E., Whitney, C.W., Redline, S., Lee, E.T., Newman, A.B., Javier Nieto, F., O'Connor, G.T., Bole, L.L., Schwartz, J.E., e Samet, J.M. 2001. Sleep-disordered breathing e cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163:19-25.
49. Harding, V.B., Jones, L.R., Lefkowitz, R.J., Koch, W.J., e Rockman, H.A. 2001. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival e augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5809-5814.

50. Ellmers, L.J., Knowles, J.W., Kim, H.S., Smithies, O., Maeda, N., e Cameron, V.A. 2002. Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy e fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H707-714.
51. Knowles, J.W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J.R., Fox, J.E., Smithies, O., Rockman, H.A., e Maeda, N. 2001. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 107:975-984.
52. Nusz, D.J., White, D.C., Dai, Q., Pippen, A.M., Thompson, M.A., Walton, G.B., Parsa, C.J., Koch, W.J., e Annex, B.H. 2003. Vascular rarefaction in peripheral skeletal muscle after experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1554-1562.
53. Dipla, K., Mattiello, J.A., Jeevaneam, V., Houser, S.R., e Margulies, K.B. 1998. Myocyte recovery after mechanical circulatory support in humans with end-stage heart failure. *Circulation* 97:2316-2322.
54. Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., e Rockman, H.A. 2001. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem* 276:18953-18959.

**Figura 1**

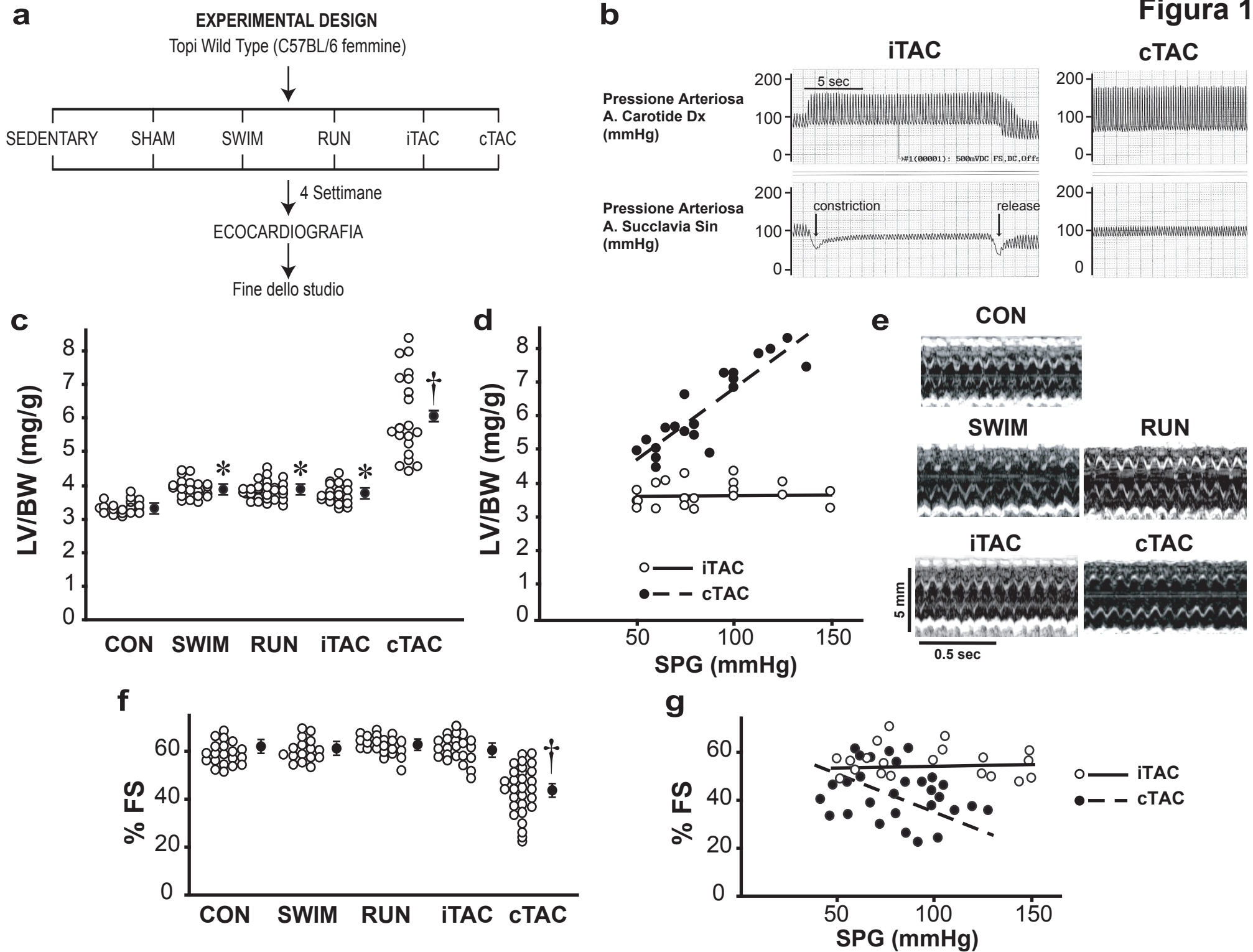
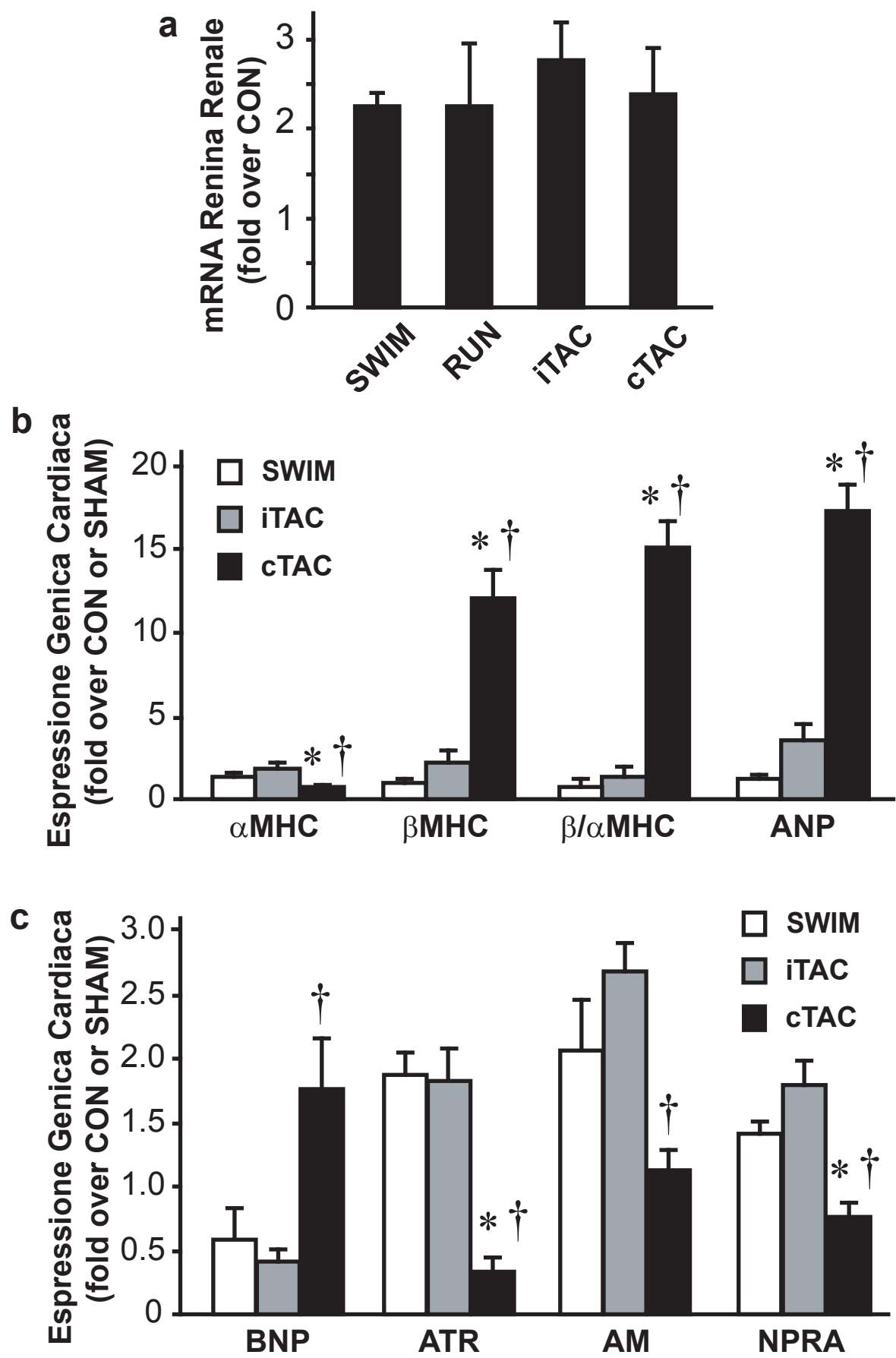
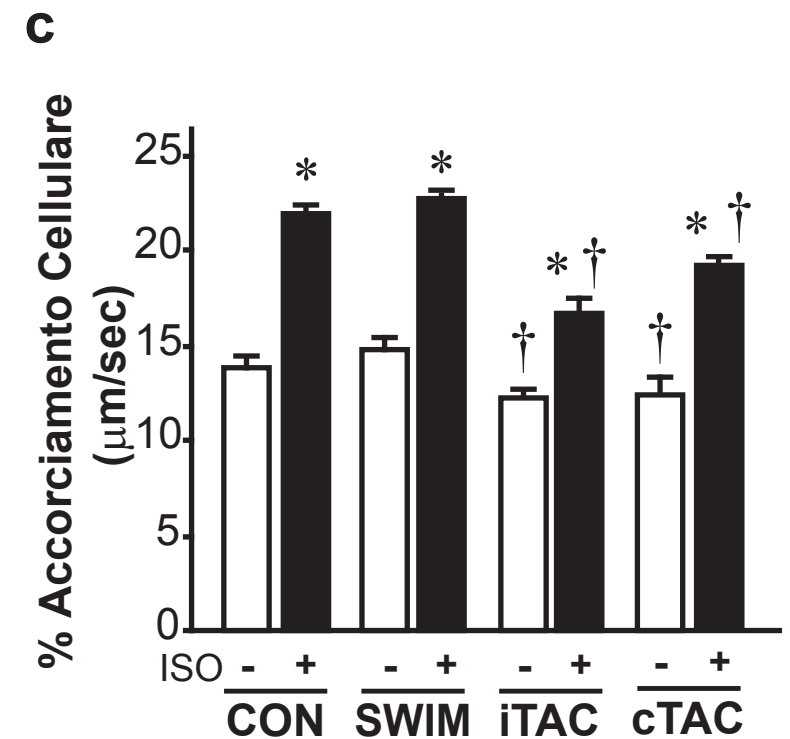
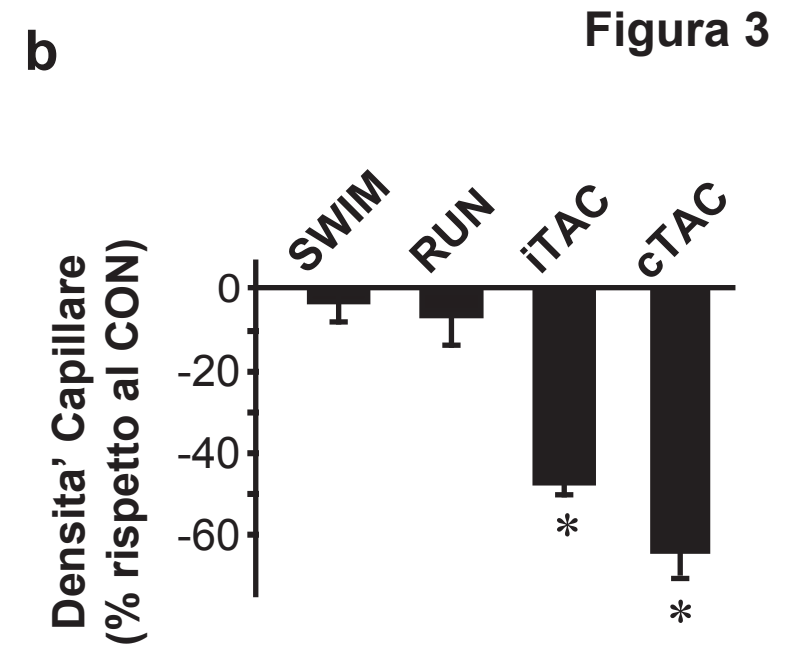
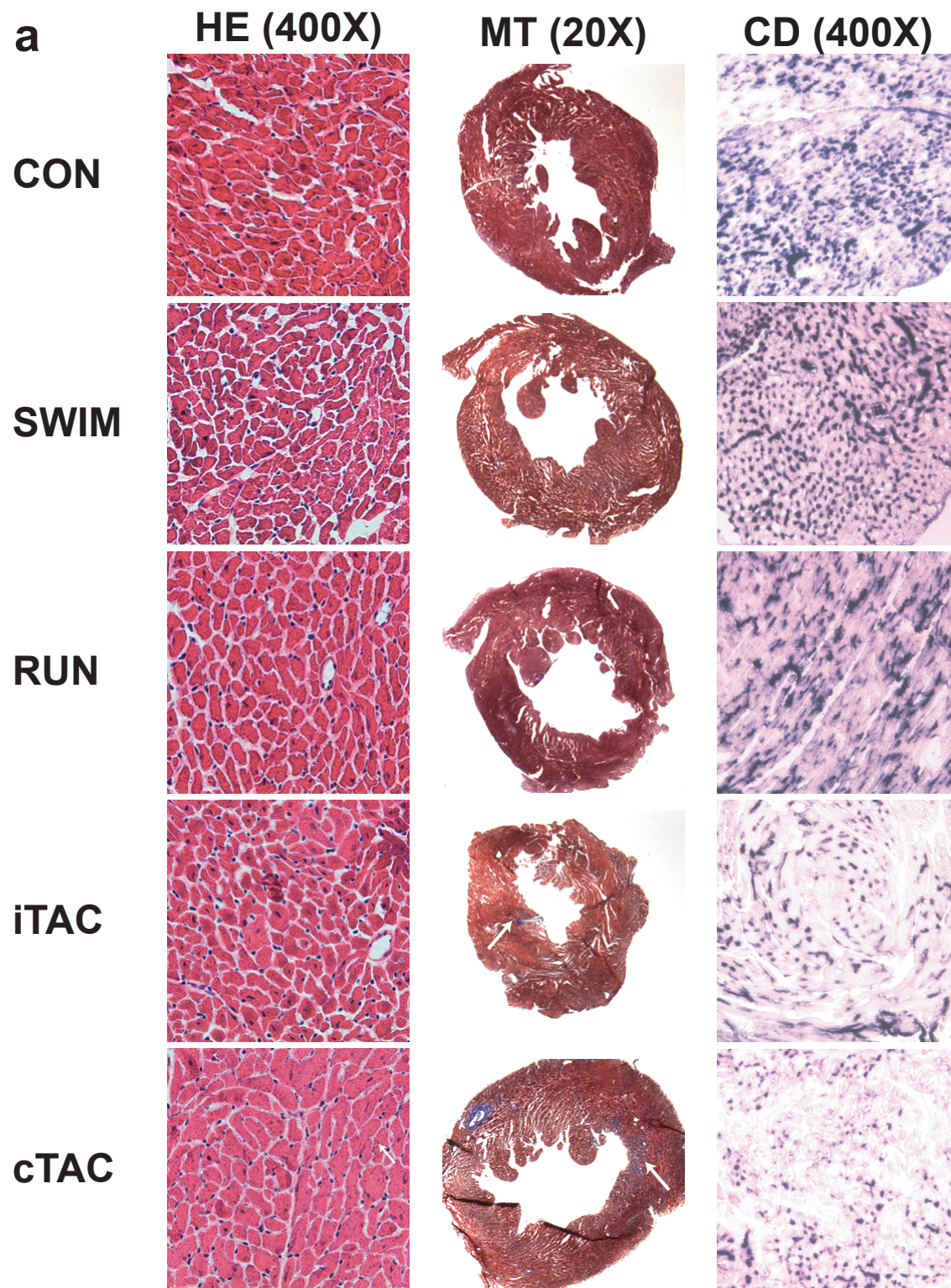


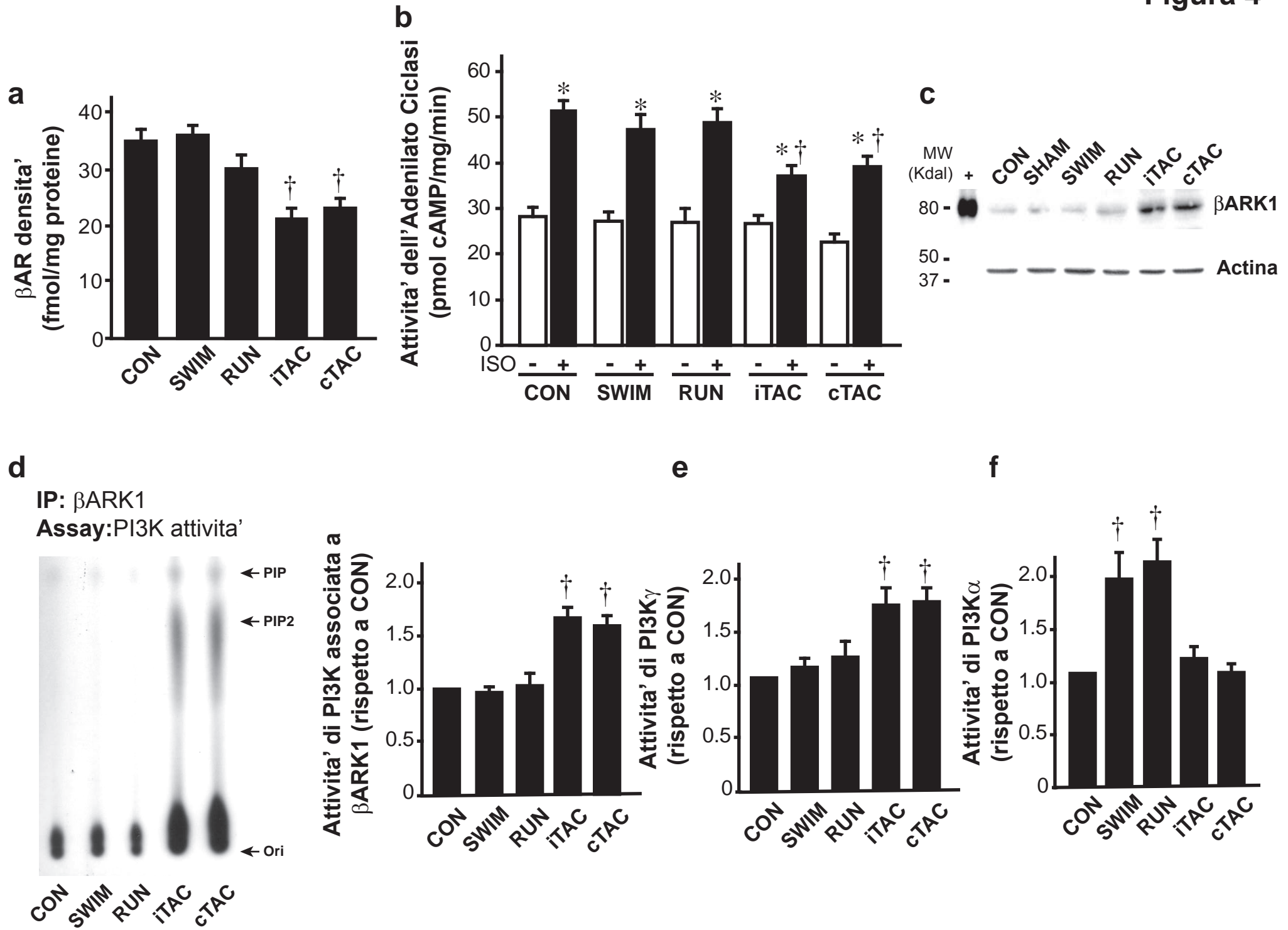
Figura 2





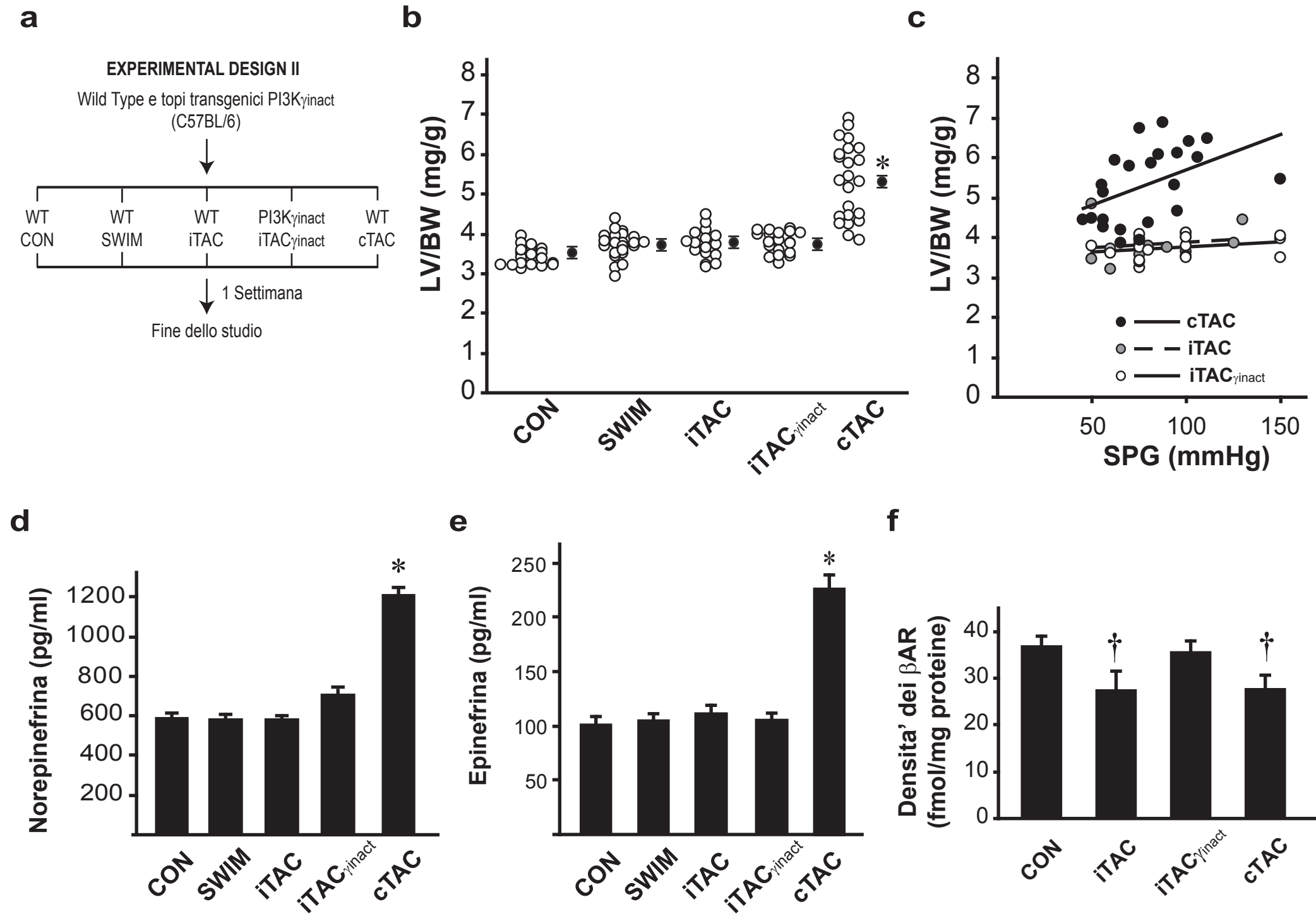


**Figura 4**

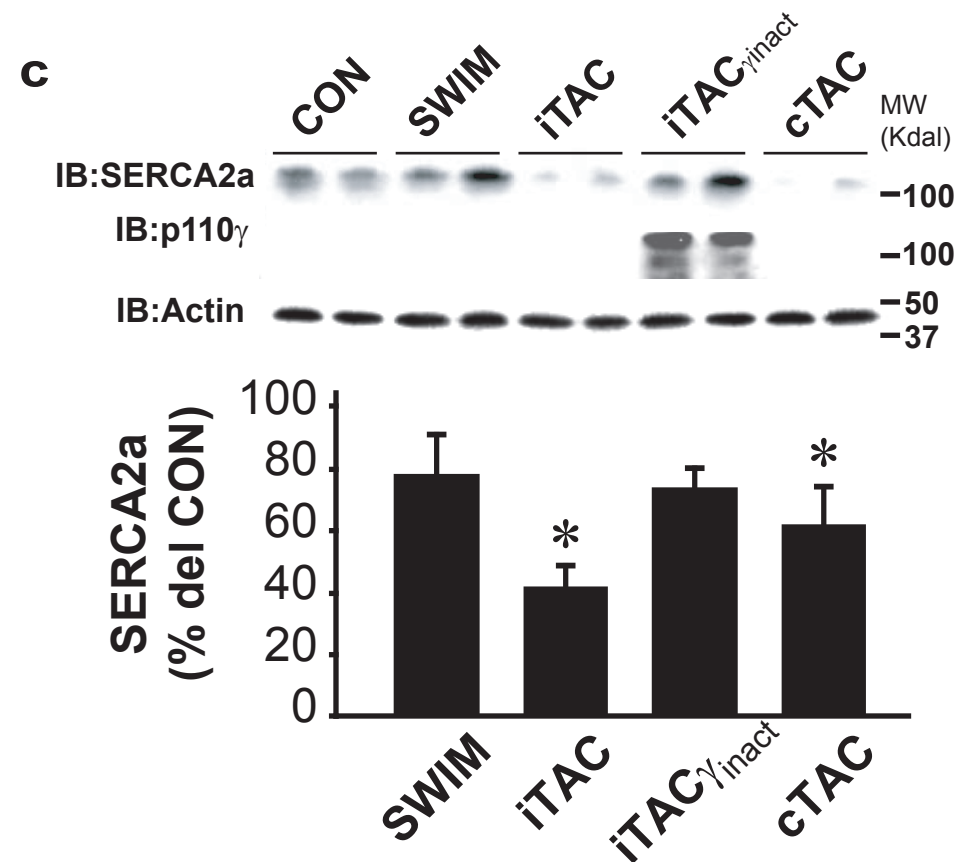
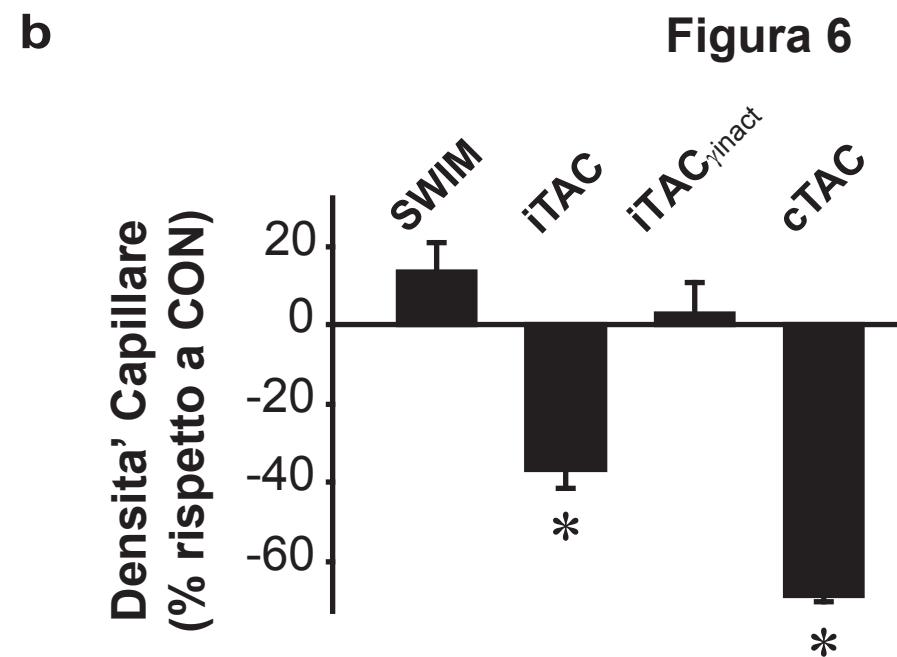
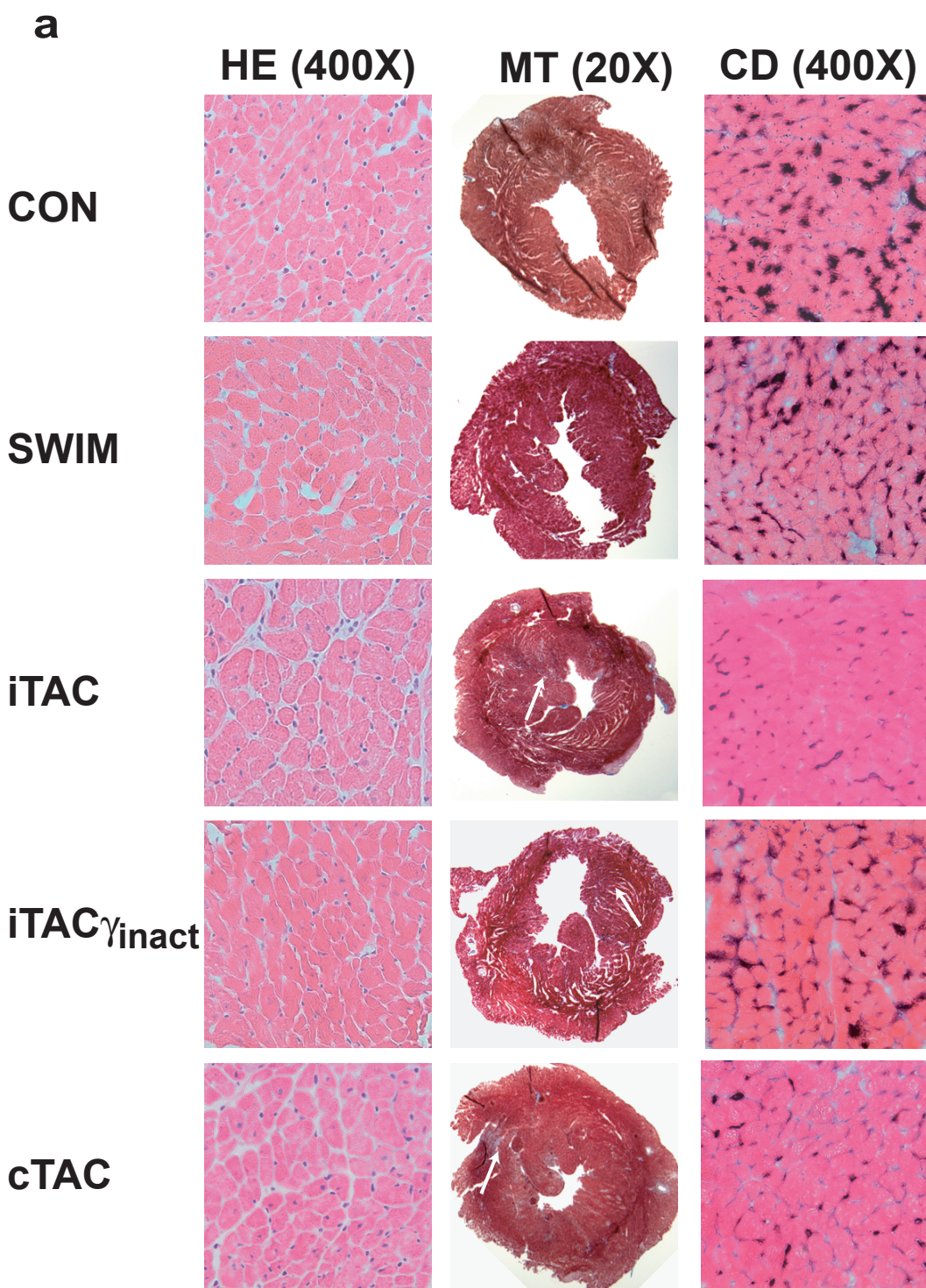




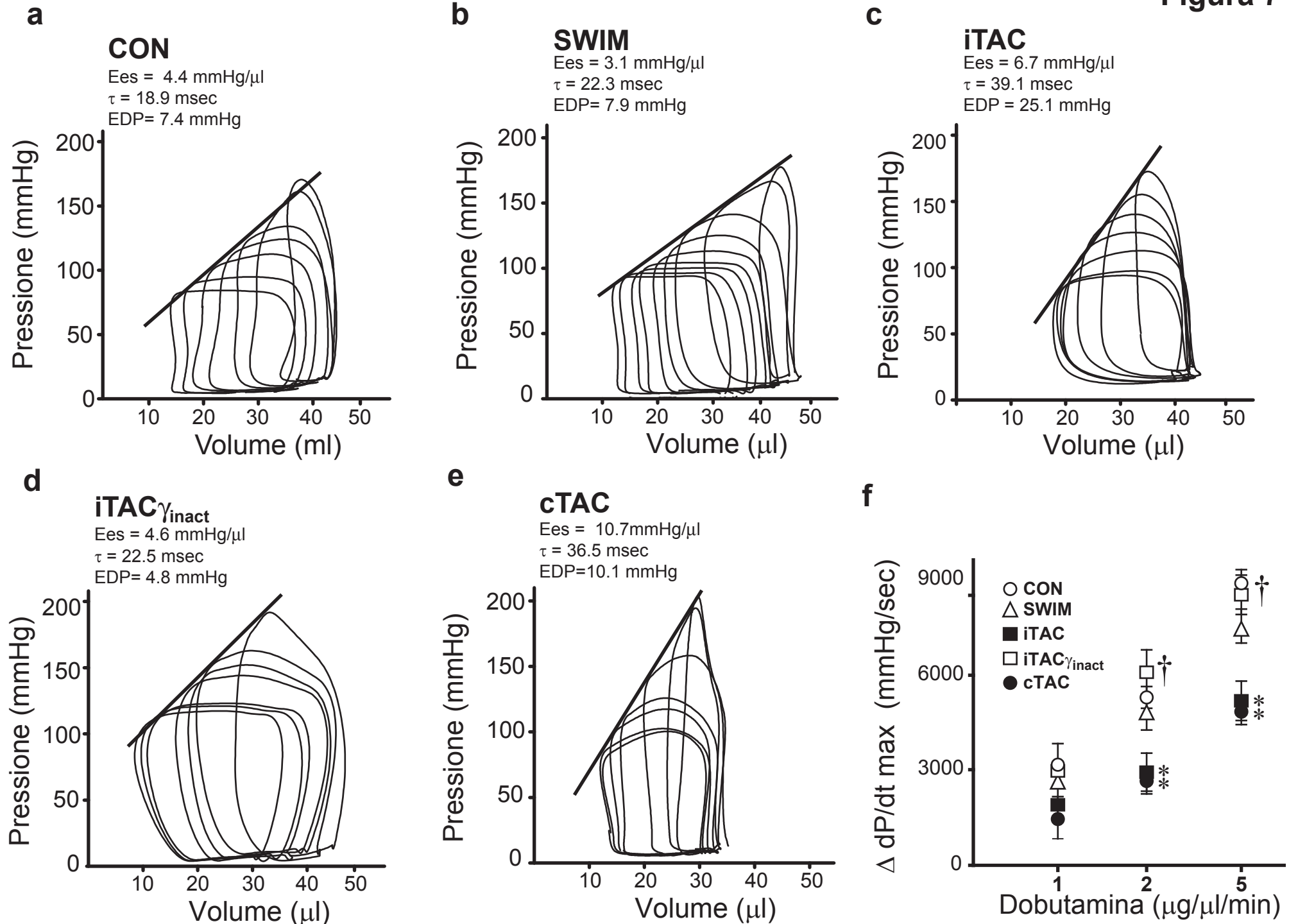
**Figura 5**



**Figura 6**

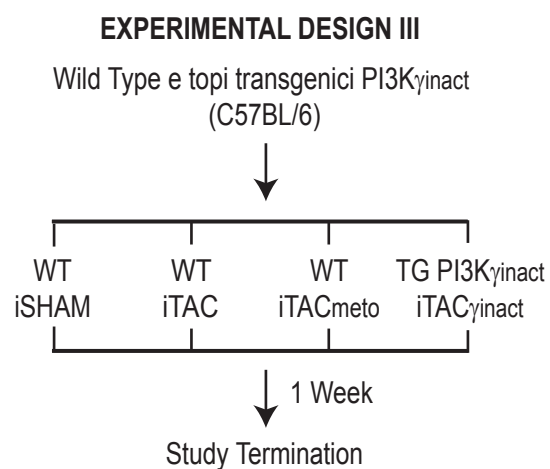


**Figura 7**

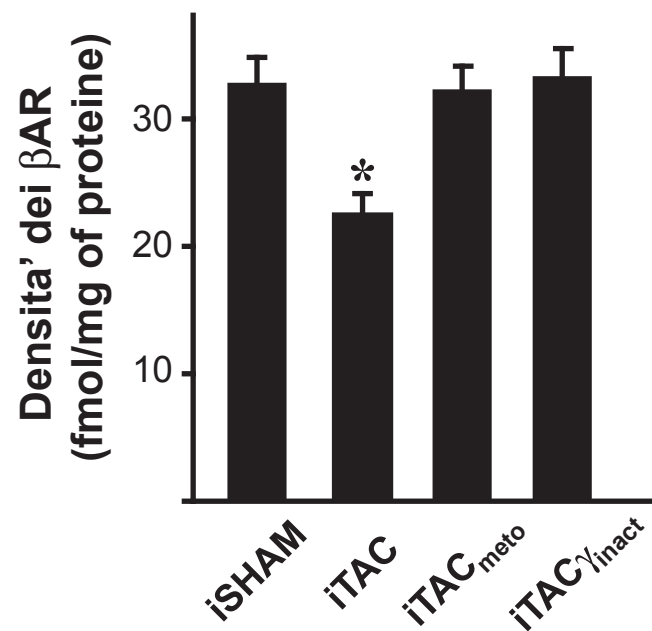


**Figura 8**

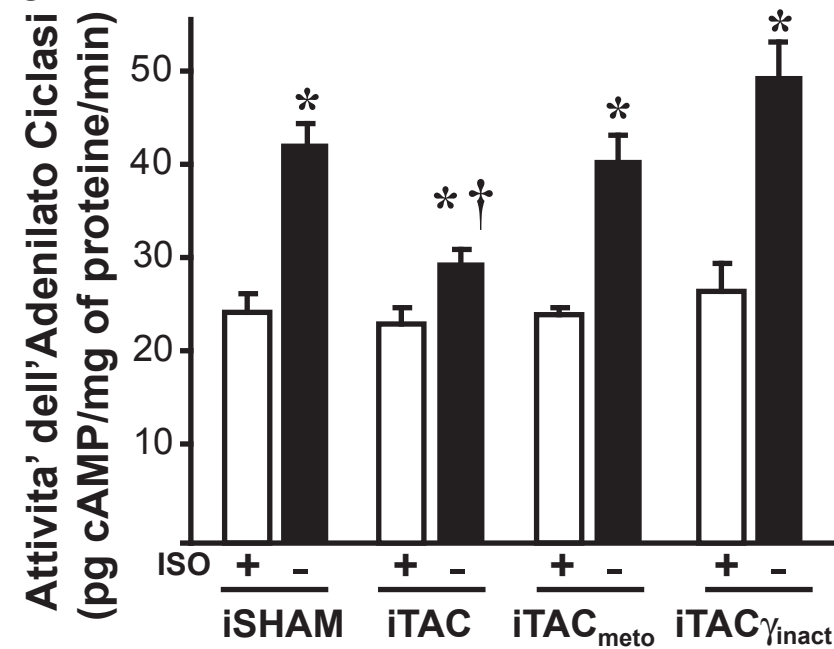
**a**



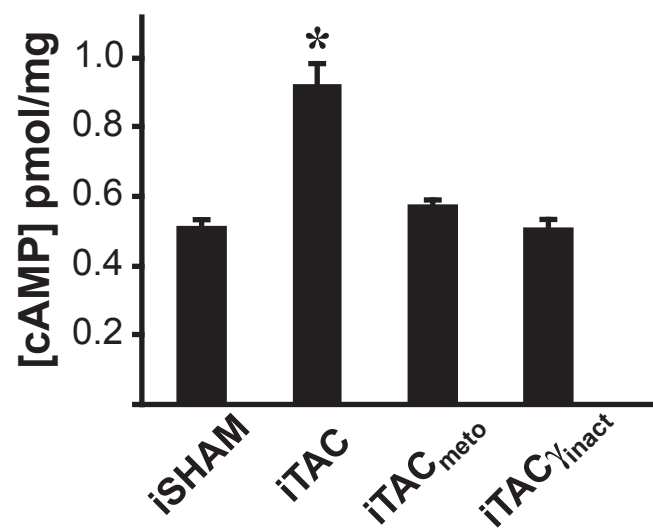
**b**



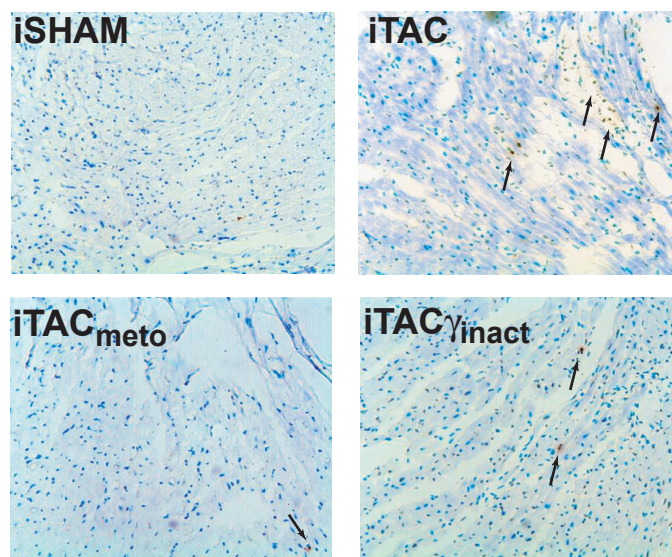
**c**



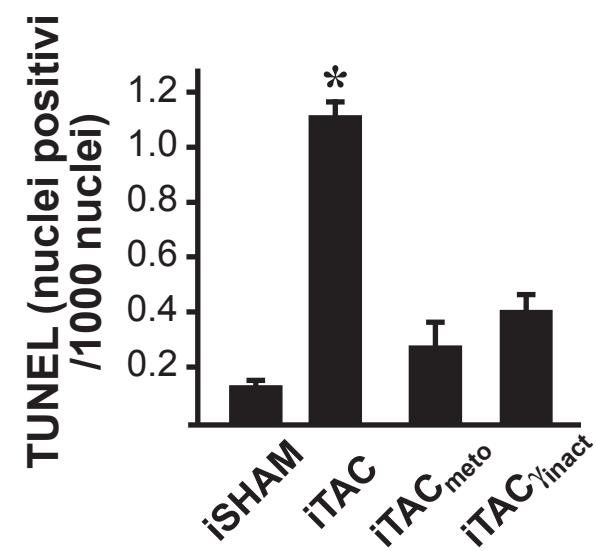
**d**



**e**



**f**





**Figura 9**

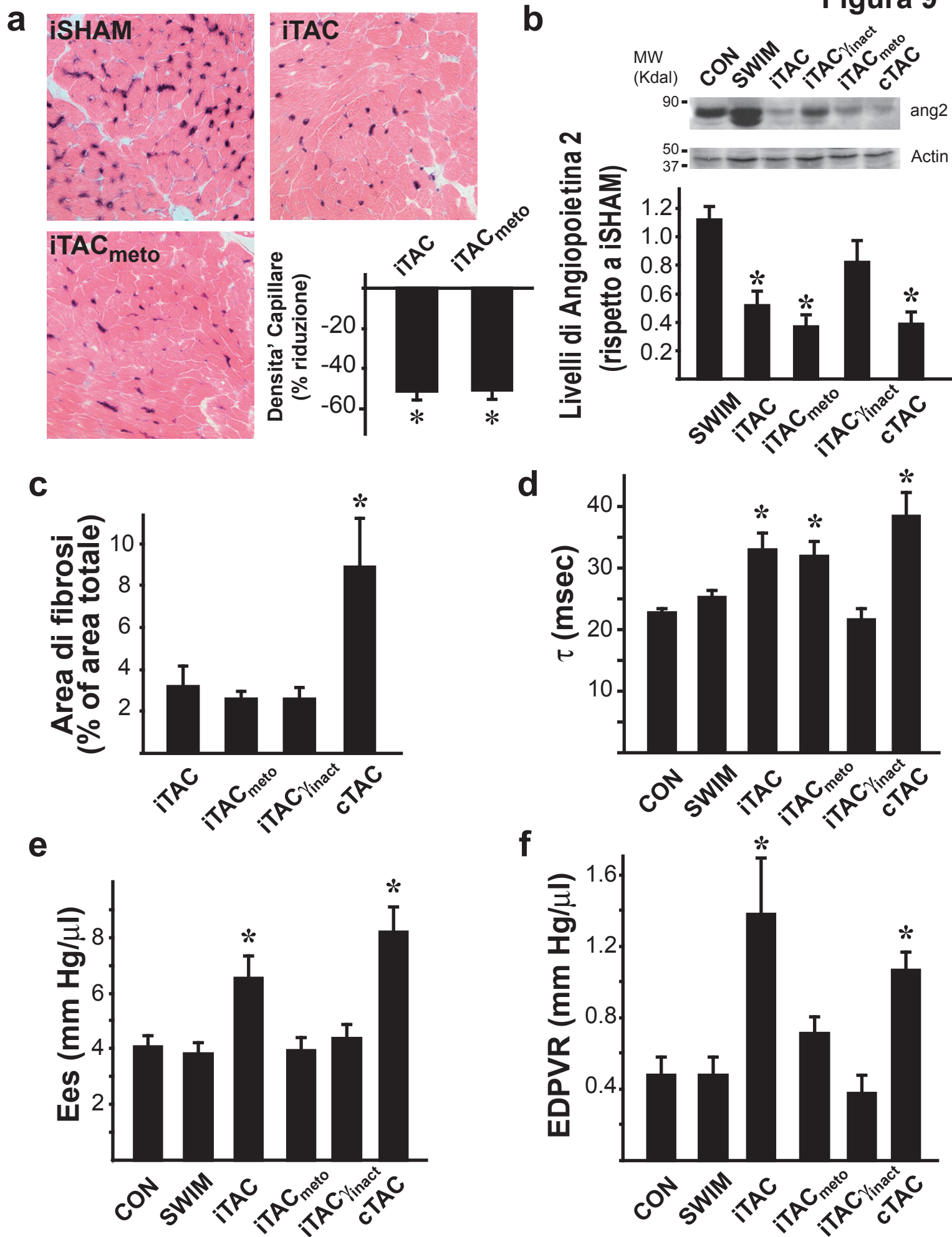
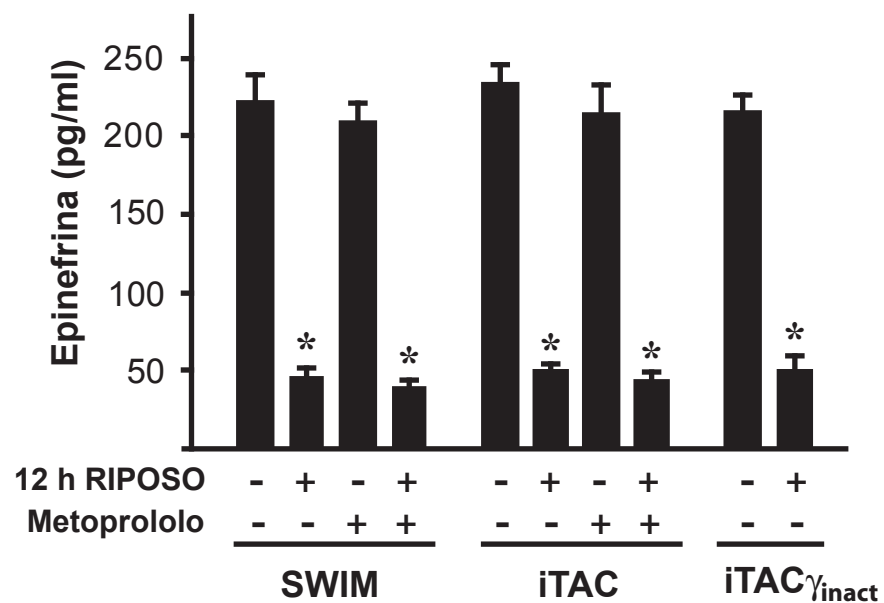
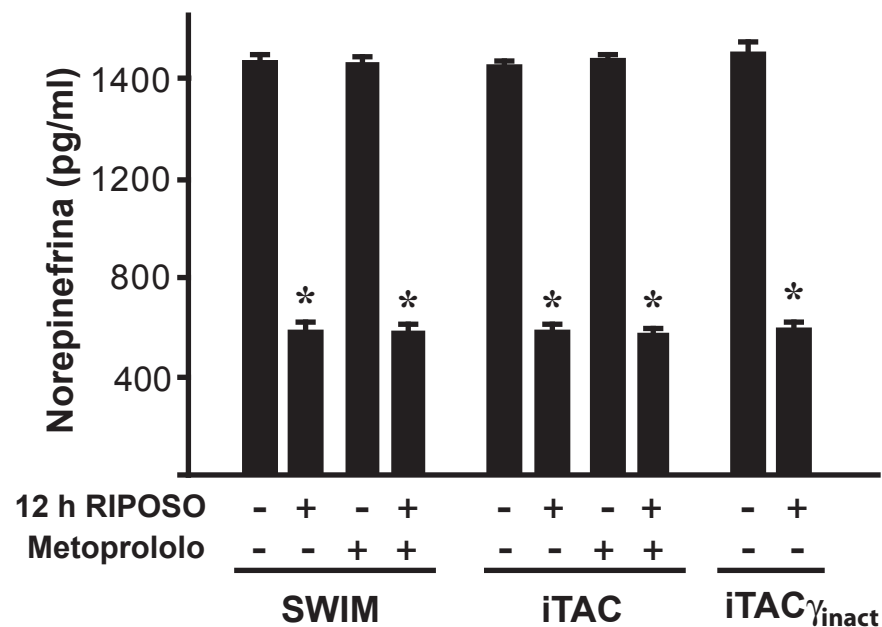


Figura 10

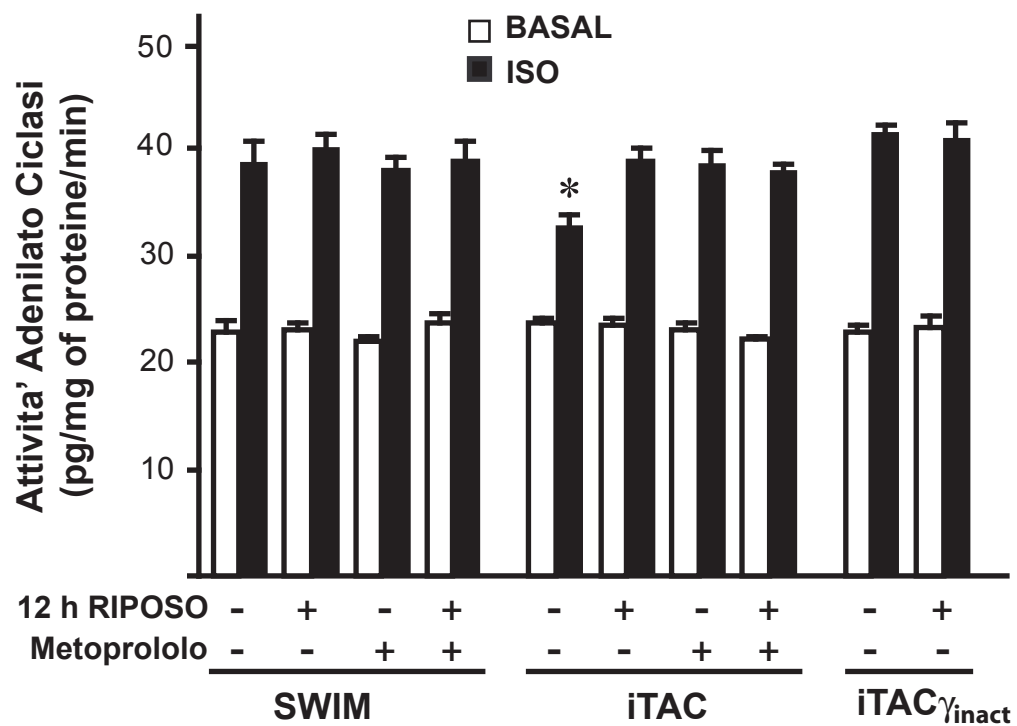
**a**



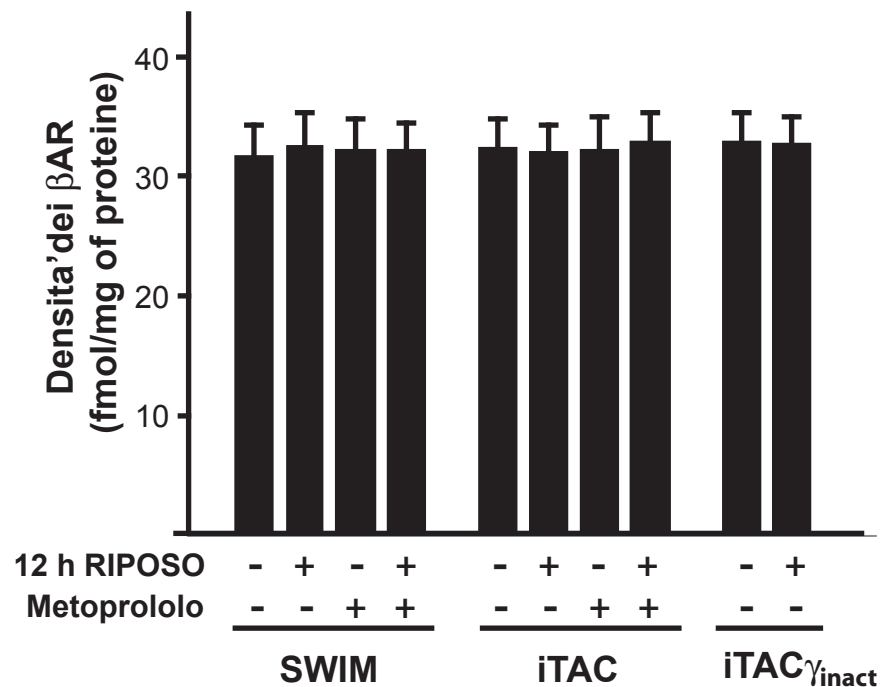
**b**



**c**



**d**



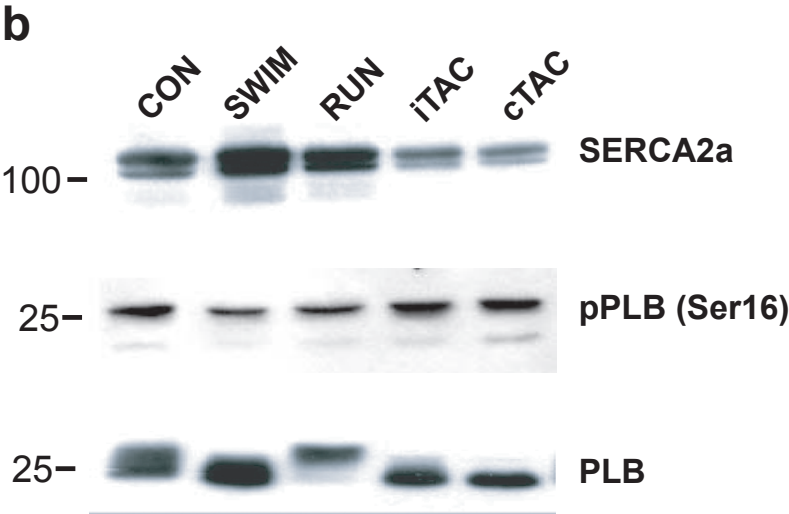
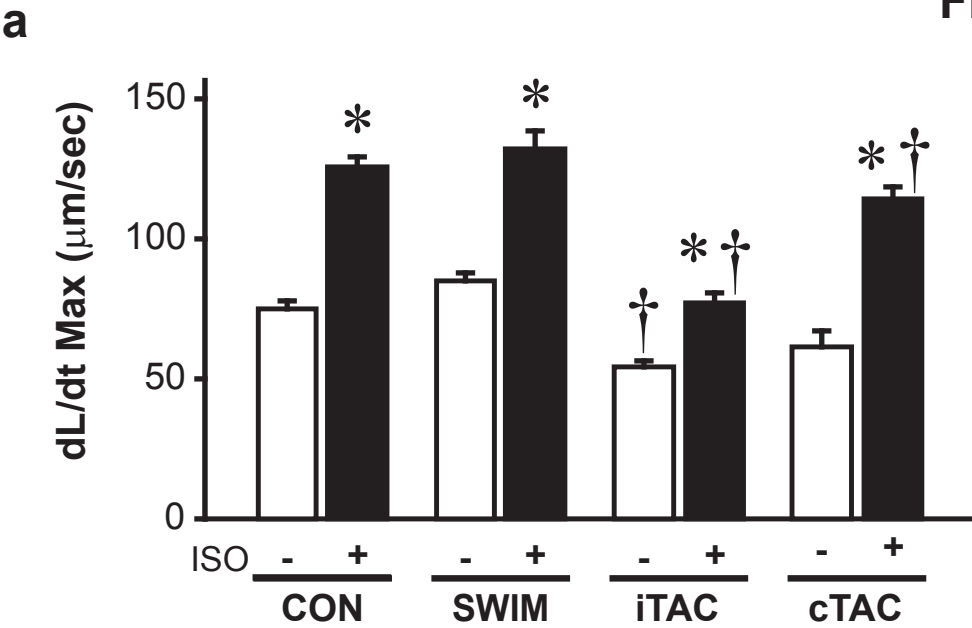


Figura Supplementare 2

